

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

16 SEP 2003

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 26 SEP 2003

WIPO

PCT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

102 58 971.2

**Anmeldetag:**

16. Dezember 2002

**Anmelder/Inhaber:**

SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

**Bezeichnung:**

Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder  
Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

**IPC:**

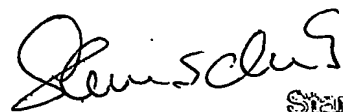
A 23 K, C 12 N, A 01 H

**Bemerkung:**

Die nachgereichte vollständige Seite 60 der Beschrei-  
bung ist am 10. Januar 2003 eingegangen.

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 9. September 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

  
Stanschus

## Patentansprüche

1. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.  
5
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet werden.  
10
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.  
15
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.  
20
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.  
25
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.  
30
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.  
35

## 2

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
- 5 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
- 10 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Eidotter.
- 10 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
- 15 12. Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfutterkomponenten.
- 20 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.
- 25 14. Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 30 15. Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 35 16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
18. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatridae.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
25. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.
26. Tierfutterzubereitung, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanz-

zentellen der Gattung Tagetes.

27. Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

28. Pigmentiermittel nach Anspruch 27, bestehend aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

29. Pigmentiermittel nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

#### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

10

Aufgrund seiner farbgebenden Eigenschaften wird Astaxanthin als Pigmentierstoff in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

15

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliches Astaxanthin, wird heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

20

Synthetisches oder durch Isolierung gewonnenes natürliches Astaxanthin wird durch spezielle Formulierungstechniken zur Erhöhung der Lagerfähigkeit chemisch und/oder physikalisch stabilisiert und für den jeweiligen Verwendungszweck entsprechend der gewünschten Applikationsbereiche und Bioverfügbarkeiten aufbereitet.

25

WO 9201754 beschreibt eine astaxanthinhaltige Wildtyppflanze der Spezies *Adonis aestivalis*. Ferner offenbart das Dokument die Verwendung der astaxanthinhaltigen Petalen von *Adonis aestivalis* sowie deren Extrakte als Fischfutter oder als Zusatz in Fischfutter zur Pigmentierung von Fischen.

30

Die Verwendung von *Adonis aestivalis* als pflanzliche Quelle für Astaxanthin zur Pigmentierung von Fischen im Stand der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass der Ertrag an astaxanthinhaltiger Biomasse und damit an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial pro Anbaufläche sehr gering ist, und somit nur doch kostenintensiven Anbau großer Flächen eine befriedigende Menge an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial erhalten werden kann. Dies führt zu hohen Kosten bei der Herstellung entsprechender Pigmentiermittel.

35

## 2

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Pigmentiermittel zur Verfügung zu stellen, die den Nachteil des Standes der Technik nicht mehr aufweisen.

5 Demgemäss wurde gefunden, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere verwendet werden können.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden bevorzugt Pflanzen der Gattung Tagetes verstanden, die in mindestens einem Teil der Pflanze einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Das Astaxanthin kann in freier Form in Form von Fettsäure-Di- oder Monoester vorliegen. Bevorzugte Pflanzen der Gattung Tagetes sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies Tagetes erecta, Tagetes patula, die auch als Marigold bezeichnet werden, Tagetes lucida, Tagetes pringlei, Tagetes palmeri, Tagetes minuta, Tagetes lemmonii, Tagetes tenuifolia, oder Tagetes campanulata, besonders bevorzugt Tagetes erecta oder Tagetes patula.

20

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzenteilen von Pflanzen der Gattung Tagetes werden vorzugsweise Teile von Pflanzen verstanden, die in mindestens einem Teil des Pflanzenteils einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Bevorzugte Pflanzenteile sind beispielsweise Blüten, Blütenköpfe oder besonders bevorzugt Blütenblätter, die auch als Petalen bezeichnet werden.

25

Wildtyppflanzen der Gattung Tagetes weisen kein Astaxanthin jedoch Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin in Blüten auf. Es wurde jedoch erfindungsgemäss gefunden, dass die Pflanzen der Gattung Tagetes beispielsweise durch genetische Veränderung in die Lage versetzt werden können, Astaxanthin herzustellen.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Pflanzen der Gattung Tagetes beispielsweise dadurch in die Lage versetzt Astaxanthin herzustellen, indem in den genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes im Vergleich zum Wildtyp eine Ketolase-Aktivität verursacht wird.

35 Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

## 3

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

- 5 Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze der Gattung *Tagetes* verstanden.

- 10 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) der Gattung *Tagetes* oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* oder beides verstanden werden.

- 15 Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Astaxanthin jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

- 20 Diese Referenzpflanze der Gattung *Tagetes* ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*, ganz besonders bevorzugt *Tagetes erecta* L., Accession number: TAG 72, Sorte Orangenprinz, erhältlich aus der Genbank des IPK, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.

- 25 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 30 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten  $\beta$ -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

- 35 Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze der Gattung *Tagetes* weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität, vorzugsweise in Blütenblättern, auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, trans-



gen eine Ketolase zu exprimieren.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Pflanzen der Gattung Tagetes durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure  
5 kodierend eine Ketolase.

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren in die Ausgangspflanze der Gattung Tagetes.

10

Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze der Gattung Tagetes nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

25 Haematoccus pluvialis, insbesondere aus Haematoccus pluvialis Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

30

Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

Aliccaligenes spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 8),

35

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

## 5

Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16),

10 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 81); Protein: Acc.-No. ZP\_00111258 (SEQ ID NO: 82) (als putatives Protein annotiert),

15 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 83), Protein: (SEQ ID NO: 84) (nicht annotiert),

*Synechococcus* sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ\_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 85), Protein: Acc.-No. ZP\_00115639 (SEQ ID NO: 86) (als putatives Protein annotiert), oder

20

*Brevundimonas aurantiaca* (WO 02079395).

25 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

30 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenter (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

5

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50\_C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50\_C, bevorzugt bei 65\_C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

10

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22\_C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65\_C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42\_C ausgeführt.

20 Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrill sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65\_C, oder

25

(ii) 6X SSC bei 45\_C, oder

(iii) 6X SSC bei 68\_C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

30 (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68\_C, oder

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42\_C, oder

35

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42\_C, oder

- (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll; 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42\_C, oder
- (viii) 2X oder 4X SSC bei 50\_C (moderate Bedingungen), oder
- 5 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42\_ (moderate Bedingungen).
- (2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel
- 10 (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50\_C, oder
- (ii) 0.1X SSC bei 65\_C, oder
- (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68\_C, oder
- 15 (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42\_C, oder
- (v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42\_C, oder
- 20 (vi) 2X SSC bei 65\_C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

30 Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

35

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren ab-

geleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:  
Gap penalty 10  
Gap length penalty 10  
Pairwise alignment parameter:  
K-tuple 1  
Gap penalty 3  
Window 5

Diagonals saved

5

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der tagetesspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Pflanzen der Gattung Tagetes leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze der Gattung ein.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze der Gattung ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, daß die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze der Gat-

tung Tagetes eingebracht.

Besonders bevorzugte Pflanzen der Gattung Tagetes als Ausgangspflanzen oder erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies Tagetes  
5 erecta, Tagetes patula, die auch als Marigold bezeichnet werden, Tagetes lucida, Tagetes pringlei, Tagetes palmeri, Tagetes minuta, Tagetes lemmonii, Tagetes tenuifolia, oder Tagetes campanulata, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Ta-  
10 getes verwendet, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

5 Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten,  $\beta$ -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivi-  
20 tät aufweist,  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Prote-  
in Hydroxylase umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zea-  
xanthin oder Astaxanthin verstanden.

25 Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge  $\beta$ -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

30 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

35 Unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\beta$ -Cyclase verstanden.

Unter einer  $\beta$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\beta$ -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer  $\beta$ -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist,  $\gamma$ -Carotin in  $\beta$ -Carotin umzuwandeln.

5 Dementsprechend wird unter  $\beta$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. gebildete Menge  $\beta$ -Carotin verstanden.

Bei einer erhöhten  $\beta$ -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\beta$ -Cyclase die umgesetzte Menge  $\gamma$ -Carotin bzw. die gebildete Menge  $\beta$ -Carotin erhöht.

10

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

15

Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

25 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.; Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

30 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalase, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C  
35 inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.



## 12

Die Bestimmung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der  $\beta$ -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250  $\mu$ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250  $\mu$ g an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder  $\beta$ -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder  $\beta$ -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung *Tagetes*.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen der Gattung

Tagetes eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase verstanden:

5 Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder  $\beta$ -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

10 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder  $\beta$ -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

15 Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

20 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine  $\beta$ -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes  $\beta$ -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine  $\beta$ -Cyclase codiert, verwendet werden.

30 Bei genomischen Hydroxylase- bzw.  $\beta$ -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

35 Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764; (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

## 14

Ein Beispiel für ein  $\beta$ -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, codierend eine  $\beta$ -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20).

5 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen der gattung Tagetes liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder  $\beta$ -Cyclase-Gen vor.

10 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine  $\beta$ -Cyclase auf.

15 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

20 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO: 18 leicht auffinden.

25 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

30 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

35

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

## 15

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

- 10 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als  $\beta$ -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer  $\beta$ -Cyclase aufweisen.

15

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

20

Weitere Beispiele für  $\beta$ -Cyclasen und  $\beta$ -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

25

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der  $\beta$ -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.

- 30 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 35 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.

- Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder  $\beta$ -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.
- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen der Gattung *Tagetes* gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität auf.
- Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase verstanden.
- Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.
- Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln.
- Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.
- Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.
- Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.
- Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfol-

gen.

Eine Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Vorzugsweise wird die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. die  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder die  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 5 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 10 b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 15 c) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 20 d) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 25 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 f) Einbringen mindestens einer den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem  $\epsilon$ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes  $\epsilon$ -Cyclase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen  $\epsilon$ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.
- 35

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer  $\epsilon$ -Cyclase oder einer deren Expression gewährende Expressionskassette vorteilhaft sein.

- 5 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der  $\epsilon$ -Cyclase, des Transports der  $\epsilon$ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines  $\epsilon$ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder
- 10 -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

15

- a) Einbringen einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA)

20

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

25

Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

30

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

35

Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur



aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Unter dem Begriff " $\epsilon$ -Cyclase-Transkript" wird der transkripierte Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

## 21

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA Teile des  $\epsilon$ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthält.

10

Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

15

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

20

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und

25

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

30

Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

35

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und

## 22

- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

5 Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

10

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.

20

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

25

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

30

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

35

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.
- 10 Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst
- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- 15 b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.
- Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.
- 20 Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:
- 25 SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase
- SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase
- 30 SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase
- SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase
- SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors
- 35 SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die

jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

- 5 Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

- 10 Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

- 20 Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

- 25 Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- 30 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- 35 c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

## 25

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-

5 Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

15

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in

20 das Genom vorteilhaft.

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

25

b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA)

30

Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu vermindemde  $\epsilon$ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation der  $\epsilon$ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung

35 in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

Eine  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der  $\epsilon$ -Cyclase komplementär sein, sich auf die

5 kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die  $\epsilon$ -Cyclase umfasst. Die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens

10 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen.  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

20 Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstruktes oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (z.B. einem  $\epsilon$ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triplehelikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

30 In einer weiteren Ausführungsform kann die  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA eine  $\alpha$ -anomere Nukleinsäure sein. Derartige  $\alpha$ -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen  $\beta$ -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

35

c) Einbringen einer  $\epsilon$ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA

angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzym-ähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu vermindernenden  $\epsilon$ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden  $\epsilon$ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

- 30 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

Die Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden  $\epsilon$ -Cyclase-Gens führen.

- 35 Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen  $\epsilon$ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das



eingeführte Konstrukt das zu vermindern, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323.

- 5 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38.

Bevorzugt ist die  $\epsilon$ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der  $\epsilon$ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-  
10 untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen  $\epsilon$ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

15 Eine Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol  
20 Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl  
25 Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 - 3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

30

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.

35

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die  $\epsilon$ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotech-

nology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; White-lam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

- 5 f) Einbringen von den  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die  $\epsilon$ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al. (1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral  
10 induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu vermindernenden  $\epsilon$ -Cyclase mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediiert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93;  
15 Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6):937-46).

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend  
20 für ein  $\epsilon$ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 .

- g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an  $\epsilon$ -Cyclase-Genen

25 Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologen Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)  
30

Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination)  
35 realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines  $\epsilon$ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das  $\epsilon$ -Cyclase-Gen so

verändert wird, dass die Funktionalität des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionel-

5 len homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell

10 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten  $\epsilon$ -Cyclase selektioniert.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht

20 werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-

25 methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidiny]butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.

30 Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976).

35 Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeraplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

## 31

Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu vermindernenden Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Struktur-  
aufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder
- b) Einbringen mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt Blütenblattspezifisch erfolgt.

In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines Blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

Besonders bevorzugt werden die genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes mit folgender Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

5 Genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

5 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

20 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

25 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

30 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte  $\beta$ -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

35 Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der  $\beta$ -

Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw.  $\beta$ -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von anti- $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder  $\epsilon$ -Cyclase-Inverted-Repaet-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen der Gattung Tagetes und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes, sowie die transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der

## 34

Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

5

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

10

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

15

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

20

Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopal-linsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649),

25

den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene,

30

170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

35

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzol-sulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0

335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

5 Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

10

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknes, et al. (1992) The Plant Cell

15

4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Biol 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-

20

968(1989).  
Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

25

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie  
30 beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625).  
Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

35

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.



Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

5 Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

10 Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der AP3 Promoter aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Beispiel 1).

5 Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20 Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blütenspezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

25

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

30

35

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

## 37

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-

5 Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpy-

10 rophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

15

pTP09

20

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG  
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-  
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGATCC\_BamHI

pTP10

25

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG  
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-  
30 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGATCC\_BamHI

pTP11

35

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTG  
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCT-  
CACTTTTTCCGGCCTTAAATCCAATCCCAATATCACACCTCCCGCCGCCG-  
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCT-  
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGATCC\_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopen-  
tenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der  
kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F,  
Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign prote-  
ins into the chloroplasts. Nucl. Acids Res. 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen  
sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthal-  
ten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen beste-  
hen.

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die  
von Pflanzen der Gattung *Tagetes* bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons  
können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten  
interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipu-  
liert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten  
Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der  
DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt wer-  
den.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrich-  
tung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion  
dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8,  
vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatori-  
schen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens je-  
doch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog  
zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-  
Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nuklein-  
säurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminati-  
onsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res.  
16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM.  
Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73)  
oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H,  
Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the

Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

5 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

10 Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfü- gung gestellt werden.

15 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

20 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

25 Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utili- zation, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

30 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke

in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze der Gattung *Tagetes* mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung *Tagetes* weisen im Vergleich zum Wildtyp einen Gehalt an Astaxanthin, insbesondere in Petalen auf.

Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung die Verwendung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltiger Extrakte von astaxanthinhaltigen

gen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

10 Unter astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen werden bevorzugt Lösungen, enthaltend Astaxanthin verstanden, die durch Extraktion aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit mindestens einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt wurden. Je nach verwendetem Lösungsmittel und verwendeten weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsverfahren kann das Astaxanthin in beliebigen Reinheitsgraden im Extrakt vorliegen. Es ist vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile vor Extraktion entsprechend aufzubereiten, beispielsweise die Pflanzen oder Pflanzenteile zu trocknen und zu zerkleinern, wobei die Reihenfolge beliebig ist.

15 Astaxanthin kann aus den astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gegebenenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-ether oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch eine solche Extraktion lässt sich Astaxanthin mit hoher Konzentration anreichern.

20 Anschließend kann durch Ausschütteln von Astaxanthin und chromatografische Auftrennung des Gemisches die Reinheit von Astaxanthin weiter erhöht werden. Astaxanthin liegt in der Regel als Gemisch aus Mono- und Diestern vor, meist als Ester der Palmitinsäure.

30 Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. Astaxanthinhaltige Pigmentierstoffe pigmentieren und verursachen oder intensivieren in der Regel einen rosa bis rosa-roten Farbton.

35 Bevorzugte Tiere die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können sind Tiere, ausgewählt aus der Gruppe Fische, Crustaceae oder Vögel, insbesondere Galliformes und Anatridae.

## 42

Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle.

Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse.

- 5 Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse.

Bevorzugter Anatridae ist Flamingo.

- 10 Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten oder Gänse verstanden.

- 5 Die orale Verabreichung der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere kann direkt erfolgen oder über orale Verabreichung von Tierfütterzubereitungen, denen zuvor die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes beigemischt wurden.

- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfütterzubereitungen beigemischt und die Tierfütterzubereitung an Tiere oral verabreicht.

- 25 Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfütterzubereitungen in eine Form zu prozessieren, die eine Beimischung zu entsprechenden Tierfütterzubereitung ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.
- 30

Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfütterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

- 35 Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.

- 5 Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung beige-  
10 mischt werden.

Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen eingesetzt werden.

- 15 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginat, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

- 20 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert,  
25 kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

30

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfuttermitteln.

35

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen



mit Tierfuttermitteln ermöglicht.

- Beispielsweise für Fische können die Fischfutterzubereitungen weitere übliche Fischfutterkomponenten enthalten, wie beispielsweise Fischmehl und/oder andere Proteine, Öle, wie beispielsweise Fischöle, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.

Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

<i>Komponenten</i>	<i>Gew.-%</i>	Einwaage f. 500 kg
		<i>kg</i>
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

10

Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

<i>Komponenten</i>	<i>Gew.-%</i>
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80
Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidantien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

## 45

In einer Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in getrockneter und zerkleinerter Pulverform beigemischt.

- 5 Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, können bei Fischfutter beispielsweise in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Fischfutterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung, Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfungaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.
- 15

- Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretenden Astaxanthinverluste zu vermeiden, können flüssige astaxanthinhaltige Extrakte durch die sogenannte PPA-Technik nach dem Extrusions - und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (*post pelleting application*).
- 20

- In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht.
- 25

- Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form zu prozessieren, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.
- 30

- Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.
- 35

Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die

astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter

5 Weise oral an Tiere verabreicht werden.

Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

10 Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt oral an Tiere verabreicht werden.

Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen verabreicht werden.

5

Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

20

Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

25

Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Pigmentiermittel aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie

35

vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

Bei besonders bevorzugten Pigmentiermitteln verwendet man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen.

5

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

10

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch oralen Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

15

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

20

Die Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bzw. Tierfuttermittel enthaltend diese Pigmentiermittel weisen weiterhin den Vorteil einer hohen Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit des Pigments Astaxanthin auf.

25

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Beispiel I

Herstellung astaxanthinhaltiger, genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes

30

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:  
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

35

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel I.1:

## 48

Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus  
5 *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität  
Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis*  
(Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococ-*  
10 *cus*-Medium (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.02  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ;  
pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l  $FeSO_4 \cdot H_2O$ ) gewach-  
sen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulveri-  
siert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktions-  
gefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension  
15 wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der  
wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem  
Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75%  
Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit  
1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.  
20 Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 µg Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min  
auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Bio-  
tech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1  
25 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde  
mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines  
sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers  
30 (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten  
35 Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)

- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

5

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
10	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

15

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

20

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbildung 1 und 2, Sequenzvergleiche).

25

Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

30

#### Beispiel I.2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus codiert

35

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

## 50

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

5

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

10

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

20

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

30

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

35

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Namersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressions-

## 51

vektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SphI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus plu-*  
5 *vialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürzten N-Terminus in der korrekten Orientie-  
rung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

Beispiel I.3:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille  
10 (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus  
der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der  
gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR  
15 unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15  
(SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezi-  
fischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide  
1 bis 39).

20 Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur  
auf 40\_C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 ml Reaktionsansatz, in dem enthal-  
ten war:

- 1 mg pGKETO2 PlasmidDNA
- 25 - 0.1 mg PR15 (SEQ ID NO: 32)

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem  
enthalten war:

- 30 - 11.5 ml pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

35 Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80)  
bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde  
mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines  
sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers



(PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 5 Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |     |      |            |
|-----|------|------------|
| 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
| 35X | 94_C | 1 Minute   |
| 20  | 53_C | 1 Minute   |
|     | 72_C | 1 Minute   |
| 1X  | 72_C | 10 Minuten |

- 25 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

- 30 Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 35 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit

## 53

fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJKETO4.

Beispiel 1.4:

- 5 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc sp. PCC 7120* codiert

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nostoc PCC 7120* kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc PCC 7120* (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

10

Für die Präparation von genomischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc PCC 7120*, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.04 g/l K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0.075 g/l MgSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0.036 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.222 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.39 g/l NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.079 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

15

- 20 Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc PCC7120*:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) re-suspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

25

30

- 35 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc PCC 7120*, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc PCC 7120* unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 87) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG, SEQ ID NO. 88) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5
- 1 µl einer *Nostoc PCC 7120* DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
  - 0.25 mM dNTPs
  - 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 87)
  - 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 88)
  - 10 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
  - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
  - 25.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 5
- |     |      |                 |
|-----|------|-----------------|
| 1X  | 94°C | 2 Minuten       |
| 35X | 94°C | 1 Minute        |
|     | 55°C | 1 Minuten       |
|     | 72°C | 3 Minuten       |
| 20  | 1X   | 72°C 10 Minuten |

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 87 und SEQ ID No. 88 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 89). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

Sequenzierung des Klon pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc PCC 7120*.

Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJNOST.

## Beispiel I.5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

- 5 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).
- 10 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).
- 15 Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-XhoI Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

20

## Beispiel I.5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

- 25 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

30

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

35

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

## 56

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 5 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 10 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |        |      |            |
|--------|------|------------|
| 1X     | 94_C | 2 Minuten  |
| 15 35X | 94_C | 1 Minute   |
|        | 50_C | 1 Minute   |
|        | 72_C | 1 Minute   |
| 1X     | 72_C | 10 Minuten |

- 20 Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

- 25 Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

- 30 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

- 35 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsan-

sätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 5 - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

10

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
15	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 0.5 mg A7/9 Amplifikat
- 0.25 mg A8/10 Amplifikat

30

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 m gA7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 35 - 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spe-

zifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 5 Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |     |      |            |
|-----|------|------------|
| 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
| 35X | 94_C | 1 Minute   |
| 20  | 50_C | 1 Minute   |
|     | 72_C | 1 Minute   |
| 1X  | 72_C | 10 Minuten |

- 25 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

- 35 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

## 59

Zur Herstellung einer Expressionskassetten pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem *rbcS* Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

5

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-XhoI Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *rbcS* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

15

Beispiel I.5.B:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

20

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

25

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion -635 bis -1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.90) und FNR-2 (SEQ ID No. 91) hergestellt.

30

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR1-2 (-635 bis -1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 90)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 91)



- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt

- |     |      |            |
|-----|------|------------|
| 1X  | 94°C | 2 Minuten  |
| 35X | 94°C | 1 Minute   |
|     | 50°C | 1 Minute   |
| 10  | 72°C | 1 Minute   |
| 1X  | 72°C | 10 Minuten |

Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

15

Sequenzierung des Klon pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

20

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

30 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SphI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SphI geschnittenen Vektor pJITENR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

35 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI

## 60

- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
10		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

15

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

20

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

25

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

30

Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

35

Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XhoI Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstruktkarte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment *FNR Pro-*

## 61

motor den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment *rbcS Transit Peptid* das *rbcS* Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *Nost Ketolase* (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5

Beispiel I.5C:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

10

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

15

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.93) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) hergestellt.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 30 - 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

5

Sequenzierung des Klon pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten Arabidopsis thaliana Pflanzen.

10

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 93) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 96) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 95) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

15

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

25

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 93 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 95)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 96 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten  
35 35X 94°C 1 Minute  
50°C 1 Minute  
72°C 1 Minute  
1X 72°C 10 Minuten

## 63

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und

- 5 Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 µg A1/4 Amplifikat
- 0.25 µg A2/3 Amplifikat

10

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 µl A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 15 - 50 µM dNTPs
- 2 µl 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 93) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 94) amplifiziert.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 30 - 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute

50°C 1 Minute  
72°C 1 Minute  
1X 72°C 10 Minuten

- 5 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 93 (AP3-1) und SEQ ID No. 94 (AP3-2) resultierte in einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese
- 10 Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

- 15 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITAP3P. Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3NOST.

- 20 Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

- 25 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3NOST wurde das 2.6 KB bp SacI-XhoI (partielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3NOST mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstruktkarte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207 bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketolase, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.
- 30

#### Beispiel I.6:

#### Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

- 35 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20-200 mE/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

## 65

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

5

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-

10

Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS

15

Medium resuspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakterien-suspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

35

Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurze-

lung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- 5 • Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden.
- 10 Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- 15 • Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.
- 20

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

- 25 Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.
- Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3.

- 30 Beispiel I.8  
Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

#### Beispiel I.8.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

35

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsernt und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel



## 67

wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 ml Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) entsprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden ausgekratzt.

Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ml Aceton eluiert, das Lösungsmittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

#### Beispiel I.9

#### Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 ml; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 ml Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0.75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 ml Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 ml Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0.35 g Na<sub>2</sub>S<sub>0</sub>4x10H<sub>2</sub>O und 500 ml Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na<sub>2</sub>S<sub>0</sub>4x10H<sub>2</sub>O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

#### Beispiel I.10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

- 5 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blüten-spezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).
- 10 Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.
- 15 Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 25 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 30 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |      |               |
|----|------|---------------|
| 1X | 94_C | 2 Minuten     |
| 35 | 35X  | 94_C 1 Minute |
|    |      | 50_C 1 Minute |
|    |      | 72_C 1 Minute |
| 1X | 72_C | 10 Minuten    |

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30	1X	94_C	2 Minuten
	35X	94_C	1 Minute
		50_C	2 Minuten
		72_C	3 Minuten
35	1X	72_C	10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters,

## 70

AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95\_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40\_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 0.5 mg A7/9
- 0.25 mg A8/10

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30\_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10

- 17.6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

15

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

- 20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 25 - 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 30 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
|    | 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
| 35 | 35X | 94_C | 1 Minute   |
|    |     | 50_C | 1 Minuten  |
|    |     | 72_C | 1 Minuten  |
|    | 1X  | 72_C | 10 Minuten |

## 71

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml p35SGUS INT
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 0.2 mM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minuten
	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII

(Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

- 5 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des rbcS Transit-peptides enthält, heisst pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

15 In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

25 Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

30 Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Vo-  
35 lumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech)

## 73

nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

5

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 10 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 mM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 15 - 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 mM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |    |     |      |            |
|----|-----|------|------------|
| 30 | 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
|    | 35X | 94_C | 1 Minute   |
|    |     | 58_C | 1 Minuten  |
|    |     | 72_C | 1 Minuten  |
|    | 1X  | 72_C | 10 Minuten |

35

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38 ) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1.10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunia (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).



## 75

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstruktkarte).

5 In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

10 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte).

15 In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment *CHRC* den Promoter (1537 bp), Fragment *5sense* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *5anti* die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

#### Beispiel I.12

20 Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

25 Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

30

Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel I.11 beschrieben.

35 Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel I.11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

## 76

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 mM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 mM PR49 (SEQ ID NO: 63)
- 20 - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 1X 94\_C 2 Minuten
- 35X 94\_C 1 Minute
- 58\_C 1 Minuten
- 72\_C 1 Minuten
- 30 1X 72\_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

35

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktions-

stellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat\_Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJA11 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

5 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI  
Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-  
EcoRI geschnittenen Vektor pJA11. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der  
antisense Orientierung enthält, heisst pJA14. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle  
Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem  
Polyadenylierungssignal aus CaMV.

10

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall  
Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-  
Sall geschnittenen Vektor pJA14. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase  
cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJA15. Durch die Ligation entsteht eine transkrip-  
15 tionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Region der Epsilon-  
Cyclase.

20

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des  
AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwen-  
dung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors  
pS5A15 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus pJA15 mit dem SacI-XhoI geschnittenen  
Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte).

25

In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment *AP3P* den modifizierten AP3P Promoter (771 bp),  
Fragment *3sense* die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orien-  
tierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment *3anti* die 3'region  
der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term*  
(761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

30

### Beispiel I.13

#### Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

35

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch  
zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad.  
Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwen-  
dung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, iso-  
liert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 11).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 mM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- |     |      |            |
|-----|------|------------|
| 1X  | 94_C | 2 Minuten  |
| 35X | 94_C | 1 Minute   |
|     | 53_C | 1 Minute   |
|     | 72_C | 1 Minute   |
| 1X  | 72_C | 10 Minuten |

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 11).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

## 79

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 5
- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.2 mM jedes dNTPs
- 0.2 mM PR60 (SEQ ID NO: 66)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 ml aufgefüllt

- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der
- 15 Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 93\_C: 1 Minute, 95\_C: 1 Minute
- 20
- 5X 94\_C: 30 Sekunden, 62\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten
- 1X 94\_C: 30 Sekunden, 25\_C: 3 Minuten, ramp to 72\_C in 3 Minuten,
- 72\_C: 2.5 Minuten
- 15X 94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;
- 94\_C: 10 Sekunden, 68\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;
- 25
- 94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten
- 1X 72\_C: 5 Minuten

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 30
- 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 35
- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ml aufgefüllt

## 80

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 12X 94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
94\_C: 10 Sekunden, 64\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten;  
5 94\_C: 10 Sekunden, 29\_C: 1 Minute, 72\_C: 2.5 Minuten  
1X 72\_C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 10 - 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 15 - 0.8 mM dNTP  
- 0.2 mM PR63 (SEQ ID NO: 68)  
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)  
- 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)  
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)  
- mit Aq. Dest. auf 100 µl aufgefüllt

- 20 Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20X 94\_C: 15 Sekunden, 29\_C: 30 Sekunden, 72\_C: 2 Minuten  
1X 72\_C: 5 Minuten

- 25 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 12).

- 30 Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

- 35 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

#### Beispiel I.14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von

Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterr gion der Epsilon-Cyclase cDNA).

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des bl tzenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel I.10) oder des bl tzenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel I.10) mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel I.13 ) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 mM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8  ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 0.2 mM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)

- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5    1X    94\_C   2 Minuten  
35X   94\_C   1 Minute  
      53\_C   1 Minuten  
      72\_C   1 Minuten  
10   1X    72\_C   10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

15 Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJA11 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

20 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJA11. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

30 Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

35 Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunia (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon



wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJA11 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp Sall-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkarte). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkarte).

In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

## 84

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CA17 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 15, Konstruktkarte)

In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment *CHRC* den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment *AP3P* das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

## 10 Beispiel I.15

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

15 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473-497), pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28\_C / 20 bis 200 mE / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21\_C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

20 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

25 Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5A13 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28\_C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für 30 die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

35 Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80

## 85

mMol/m<sup>2</sup> x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

10 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA<sub>3</sub>, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

15 Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden.
- 20 Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 25 • Die Zugabe von AgNO<sub>3</sub> (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 30 • Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5A13 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

## Beispiel I.16:

Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität

5 Das Blütenmaterial der transgenen Tagetes erecta Pflanzen aus Beispiel I.15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 ml Aceton resuspendiert.

10 Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert werden. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

15 Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [ug/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

20 Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 2

25

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

## Beispiel II

## Herstellung astaxanthinhaltiger Pflanzenteile der Gattung Tagetes

30

Die Blütenköpfe oder die Petalen der gemäß Beispiel I.6 hergestellten astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden abgetrennt und getrocknet. Anschließend werden die getrock-

getrockneten Blütenköpfe oder Petalen durch Zerkleinerung in Pulverform überführt.

### Beispiel III

Herstellung von astaxanthinhaltigen Extrakten und weitere Aufreinigung

5

Getrocknete Blütenblätter oder getrocknete Blütenköpfe von *Tagetes erecta*, hergestellt nach Beispiel I.6 werden in einem Homogenisator mit einem Überschuß (etwa 10 Teile Lösungsmittel mit einem Teil Pflanzenmaterial) an Lösungsmittel (wie z.B. Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Tetrahydrofuran, Ethanol, Heptan, Cycloheptan oder Petrolether, aber nicht ausschließlich beschränkt auf diese) oder mit einem Lösungsmittelgemisch (wie z.B. Aceton/Hexan, Ethanol/Hexan (50:50, v/v) oder Aceton/Methanol (7:3, v/v) homogenisiert und im Dunkeln und in der Kühle unter Schütteln extrahiert. Der Rückstand kann bis zu dreimal mit dem verwendeten Lösungsmittel/ Lösungsmittelgemisch re-extrahiert werden. Das gesammelte organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wird mittels Evaporator evaporiert, bis ein eingeeengtes Konzentrat erhalten wird. Zusätzlich kann nochmals mit Hexan extrahiert werden. Das verwendete Hexan wird (wiederum im Dunklen und in der Kühle) evaporiert.

10

15

20

25

Das solchermaßen hergestellte Konzentrat wird in Hexan gelöst und mittels Säulenchromatographie mit Silica-Material chromatografiert. Ein Teil Silicamaterial wird dazu mit 1-2 Teilen Carotinoidlösung vermischt und in eine Säule gepackt. Die Säule wird ausgiebig mit Hexan im Dunklen und in der Kühle gewaschen. Das Eluat wird verworfen. Ketocarotinoide, besonders Astaxanthin, wird durch eine Mischung von Hexan und Ethanol (2-5% Ethanol in Hexan) eluiert, bis eine orange-rötliche Fraktion eluiert. Dieses orange-rötliche Eluat wird gesammelt, bis die Farbe sich ändert. Das orange-rötlich gefärbte Eluat enthält Astaxanthin als Gemisch aus Mono- und Diestern.

### Beispiel IV

Herstellung von extrudiertem Forellenfutter, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes*

30

Die folgenden Komponenten werden in einem Doppelschneckenextruder extrudiert.

Einwaage f. 500 kg		
Komponenten	(%)	Kg
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00

	88	
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

---

Die pulverförmigen, prozessierten astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, beispielsweise hergestellt nach Beispiel II, werden vor der Extrusion als Komponente zugegeben.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes in flüssiger Form, beispielsweise hergestellt nach Beispiel III, werden nach der Extrusion auf das Extrudat aufgesprüht (Applikation durch PPA-Methode).

Die Astaxanthin-Wirkstoff-Dosierung liegt bei 10, 20 und 40 mg Astaxanthin pro kg Diät.

Nach Beendigung des Extrusionsprozesses wird das Extrudat getrocknet und gekühlt.

#### Beispiel V

Orale Verabreichung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Forellen in einem Forellenstandardfutter – Prüfung der Bioverfügbarkeit.

Das Forellenfutter, enthaltend die erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierstoffe, wird gemäß Beispiel IV hergestellt und an Forellen (durchschnittliche Lebendmasse von 180 g) oral verabreicht. Es werden 3 Konzentrationen getestet: 10, 20 und 40 mg Astaxanthin aus der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung pro kg Diät.

Die Haltung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Die Forellen erhalten standardmäßig eine Adaptationsphase von 14 Tagen.
- Während des Fütterungsversuches werden 10 Forellen pro Becken in 80 l Wasser fassenden Durchfluß-Kunststofftanks gehalten. Die Wassertemperatur liegt bei 15°C. Das

Wasser wird biologisch gereinigt und es werden täglich mindestens 10% der Gesamtwassermenge durch Frischwasser ersetzt.

- 5 • Die Beleuchtungsdauer liegt bei 12 Stunden pro Tag, um eine vorzeitige Geschlechtsreife der Tier zu vermeiden.
- Die Anzahl Becken pro Behandlung liegt bei 3. Dies ist äquivalent zu 30 Forellen pro Dosisstufe.
- 10 • Aufbewahrung der Diäten erfolgt bei -20°C, um Astaxanthinverluste zu vermeiden. Das Futter wird portionsweise (wochenweise) aufgetaut und verabreicht.
- Die Versuchsdauer beträgt 8 Wochen.

15 Die Fütterung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Bei den verabreichten Versuchsdiäten handelt es sich um das gemäß Beispiel IV hergestellte extrudierte Forellenfutter, das zusätzlich noch öl-gecoatet wird.
- 20 • Während der Adaptationsphase wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin verabreicht.
- Als Negativkontrolle wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin während des gesamten Versuchszeitraumes verabreicht.
- 25 • Die Fütterung erfolgt 2x täglich von Hand bis zur Sättigung der Tiere.

30 Untersucht wird der Einfluß der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung sowohl auf Leistungsparameter der Fische, wie Futteraufnahme, Futterverwertung und Lebendmassezuwachs als auch auf die Bioeffizienz der Pigmentierung.

Statisch ausgewertet werden durchschnittlicher Futterverbrauch pro Fisch, Futteraufwand und Lebendmassezuwachs.

35 Die Pigmentierung der Fische wird durch remissionspektrophotometrische Messungen (Minolta-a-Wert = Rotwert am Filetanschnitt) und durch Bestimmung des Astaxanthingehalts (mg/kg) im Filet jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.

## 90

Die Minoltawerte a-Werte, welche den Rotanteil des Farbtönen repräsentieren, nehmen mit kleiner werdender Steigung der Funktion dosisabhängig zu. Die Minolta b- Werte, die den Gelbanteil widerspiegeln liegen im negativen Bereich oder bewegen sich um Null. Dies bedeutet der Rotton der Forellenfilets weist eine Abhängigkeit zu der aufgenommenen Astaxanthinmenge

5 auf.

Während des Versuches werden für die beobachteten Leistungsparameter sowohl zwischen als auch innerhalb der Behandlungen (Astaxanthinhaltiges Pulver, astaxanthinhaltiger Extrakt in flüssiger Form, synthetisches Astaxanthin, Negativkontrolle) keine statistisch gerichteten Unterschiede beobachtet.

10

Es zeigt sich, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bei der Pigmentierung von Forellen als Vertreter der Salmoniden bioverfügbar sind und zudem zu keinen adversen Effekten auf die biologische Leistung der Forelle führen.

15



Abbildung 1: Nukleotidsequenzvergleich

```
KET02.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAGCGCTGAGGCACTCAAGAGAGGAGAGGAGGTTGCAGGCACTCTGACGTGTTC 10C
X86782.seq ATGCAGCTAGCAGCGACAGTAATGTTGGAGCAGCTTACCGGAGCGCTGAGGCACTCAAGAGAGGAGAGGAGGTTGCAGGCACTCTGACGTGTTC 10C

KET02.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTCGCTTCCGTCAAGAGAGTCAAGCGCGCGCCGCCCGGGAATTGAAGATGCCTACAAGCCACCACCTTCGGACACAAAGGG 20C
X86782.seq GTACATGGGCGACCCAGTACTCGCTTCCGTCAAGAGAGTCAAGCGCGCGCCGCCCGGGAATTGAAGATGCCTACAAGCCACCACCTTCGGACACAAAGGG 20C

KET02.seq CATCACAATGGCGCTAGCTGTTCATCGGCTCCCTGGGCGGCAGTGTTCCTCCAGCGCCATTTTCAAATCAAGCTTCGGACCTCCTTGGACCAGCTGCACTGG 30C
X86782.seq CATCACAATGGCGCTAGCTGTTCATCGGCTCCCTGGGCGGCAGTGTTCCTCCAGCGCCATTTTCAAATCAAGCTTCGGACCTCCTTGGACCAGCTGCACTGG 30C

KET02.seq CTGCCCGTGTCAAGTGCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCTGCTGCACATCTCTGTAATATCTTGTCTCTGAGTTCCTGTACACAGGCC 40C
X86782.seq CTGCCCGTGTCAAGTGCACAGCTCAGCTGGTTAGCGGCAGCAGCAGCTGCTGCACATCTCTGTAATATCTTGTCTCTGAGTTCCTGTACACAGGCC 40C

KET02.seq TTTTATCACCACGCGAGTATGCTATGCATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCGAGCTTAATGACTTCTTGGGCGAGATATGCATCTCCTTGTACGCCCTG 50C
X86782.seq TTTTATCACCACGCGAGTATGCTATGCATGGCACCATCGCCATGAGAAACAGGCGAGCTTAATGACTTCTTGGGCGAGATATGCATCTCCTTGTACGCCCTG 50C

KET02.seq GTTGTATTACACATGCTGCACCGCAAGCATTTGGAGCACCACAACCACTAGCGGAGGTGGCAAGGACCCCTGACTTCACAGGGGAAACCCCTGGCATT 60C
X86782.seq GTTGTATTACACATGCTGCACCGCAAGCATTTGGAGCACCACAACCACTAGCGGAGGTGGCAAGGACCCCTGACTTCACAGGGGAAACCCCTGGCATT 60C

KET02.seq GTGCCCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGCGCTTGCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGCGCCAA 70C
X86782.seq GTGCCCTGGTTTGGCAGCTTCATGTCCAGCTACATGTGATGTGGCAGTTTGGCGCGCTTGCATGGTGGACGGTGGTCATGCAGCTGCTGGGTGCGCCAA 70C

KET02.seq TGGCGAACCTGCTGGTGTTCATGGCGGCGCGGCCATCCTGTCCGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGCTACATGCCCCACAGCCTGAGCCTGGCGC 80C
X86782.seq TGGCGAACCTGCTGGTGTTCATGGCGGCGCGGCCATCCTGTCCGCTTCCGCTTGTCTACTTTGGCAGCTACATGCCCCACAGCCTGAGCCTGGCGC 80C

KET02.seq CCGCTCAGGCTCTTCACCAGCCGTCATGAATGTTGGAGTTCGCGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 90C
X86782.seq CCGCTCAGGCTCTTCACCAGCCGTCATGAATGTTGGAGTTCGCGCACTAGCCAGGCGTCCGACCTGGTCAGCTTCTGACCTGCTACCACTTCGACCTG 90C

KET02.seq CACTGGGAGCACCACCGCTGGCCCTTTGCCCCCTGGTGGGAGCTGCCCACTGCCGCCGCCCTGTCTGGCCGAGGTCCTGGTTCCTGGCTAG 99C
X86782.seq CACTGGGAGCACCACCGCTGGCCCTTTGCCCCCTGGTGGGAGCTGCCCACTGCCGCCGCCCTGTCTGGCCGAGGTCCTGGTTCCTGGCTAG 99C
```

Abbildung 2: Proteinsequenzvergleich

```
KETO2.pro  M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A 50
X86782.pro  M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A 50

KETO2.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100
X86782.pro  R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L H A I F Q I K L P T S L D Q L H W 100

KETO2.pro  L P V S E A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150
X86782.pro  L P V S E A T A Q L V S G T S S L L D I V V V F F V L E F L Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N 150

KETO2.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200
X86782.pro  R Q L N D F L G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I 200

KETO2.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250
X86782.pro  V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q L L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F 250

KETO2.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300
X86782.pro  R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L 300

KETO2.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329
X86782.pro  H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R L S G R G L V P A 329
```

Abbildung 3:

Konstrukt zur Überexpression des Ketolase  
(b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit  
rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des  
d35S-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt)

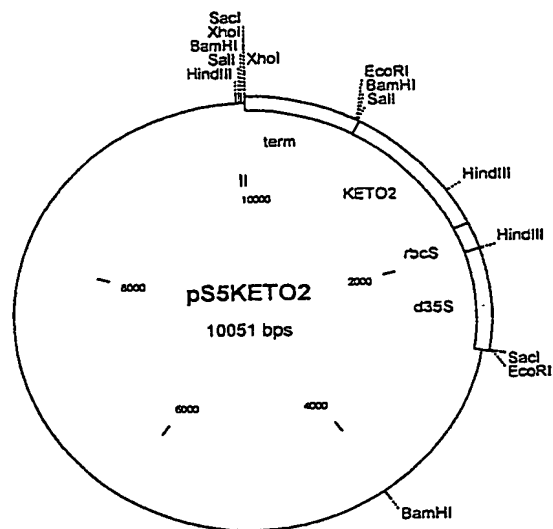


Abbildung 4: Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression der Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit *rbcS* Transitpeptide aus Erbse unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt) .

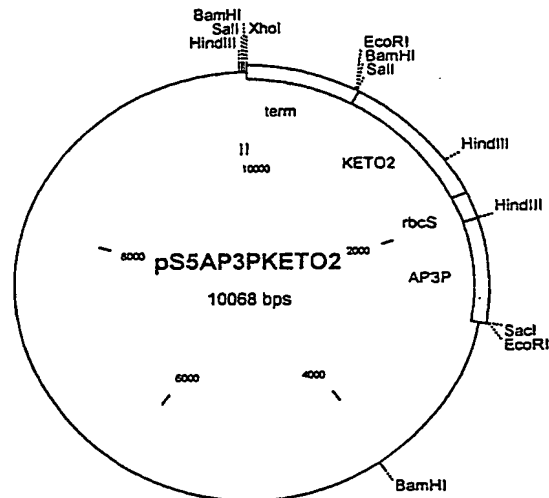


Abbildung 5

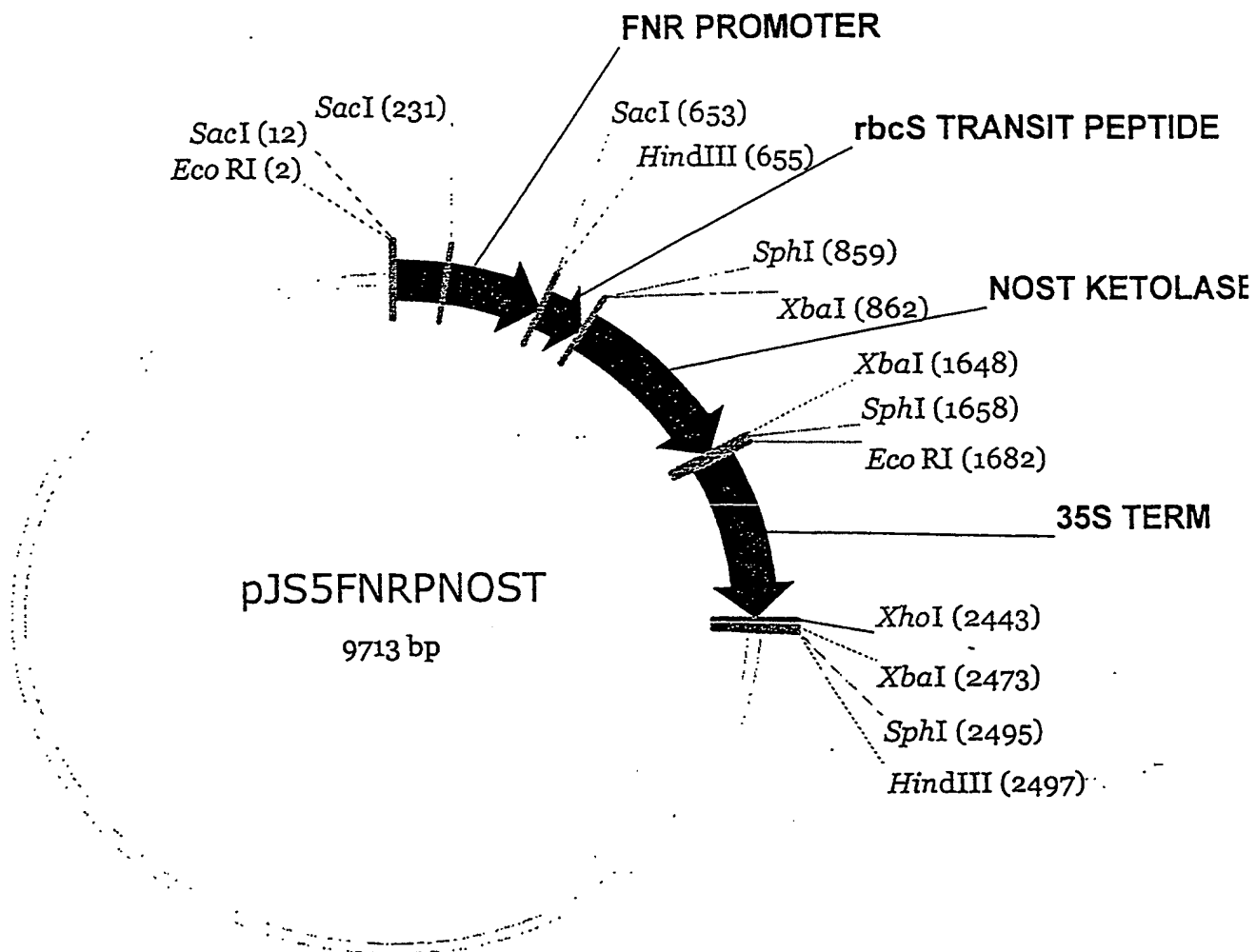


Abbildung 6

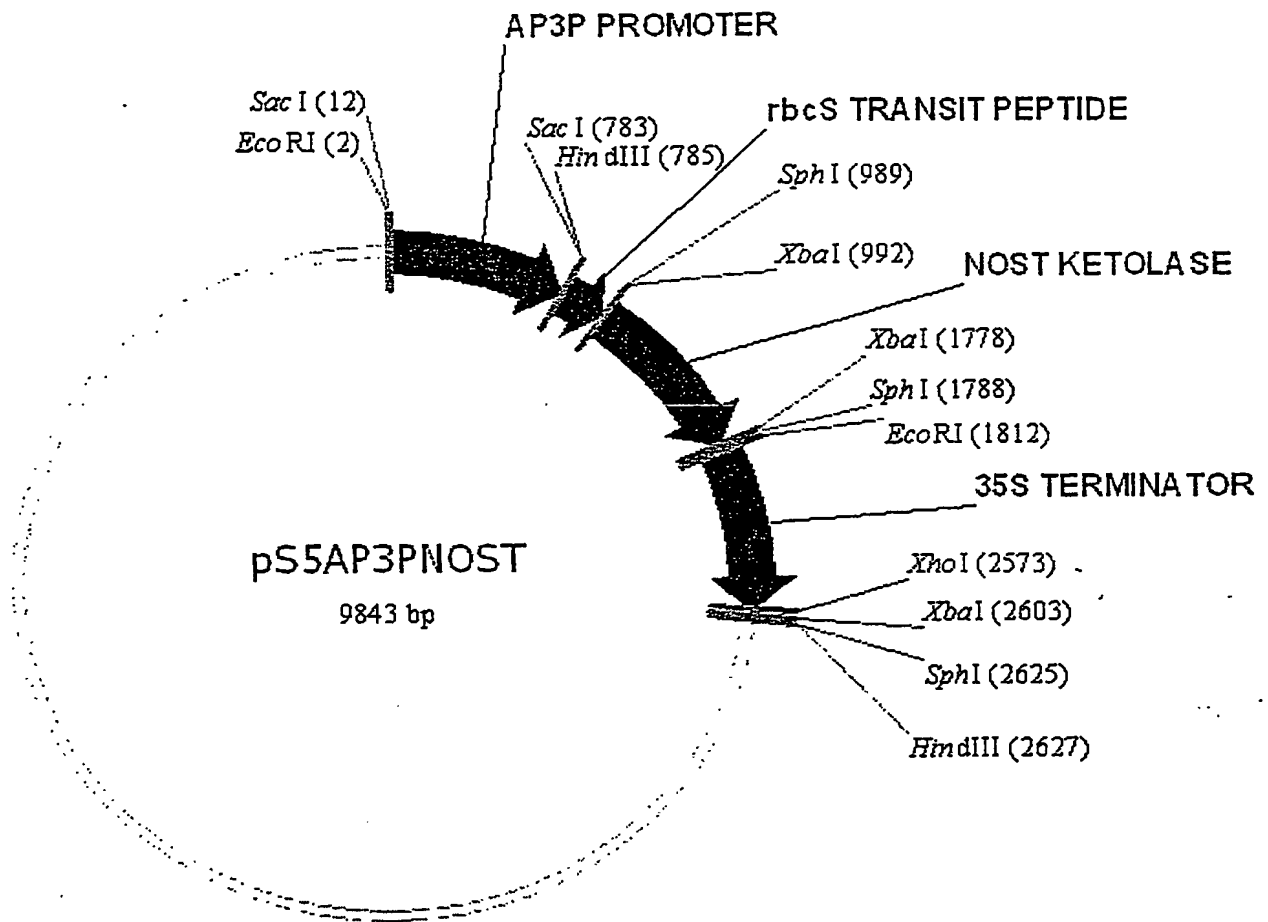


Abbildung 7:

Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten-spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

5

10

15

20

25

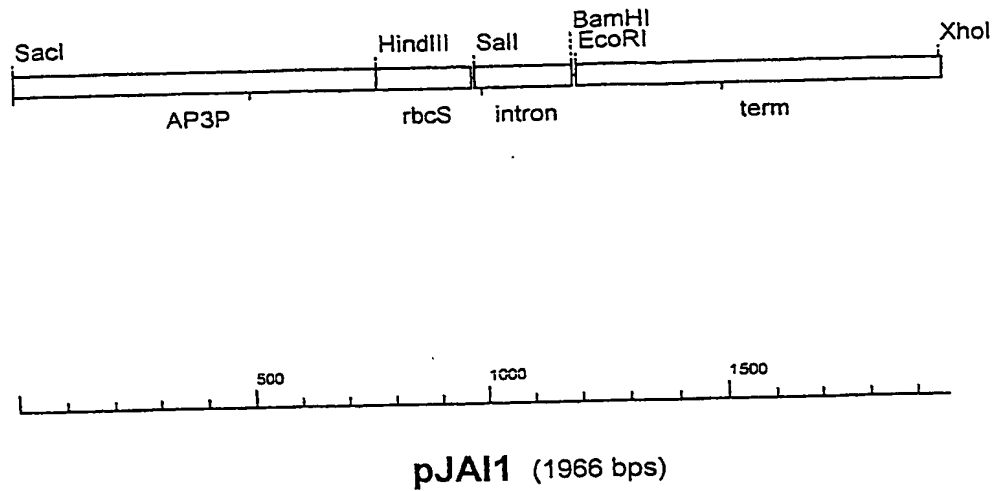


Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

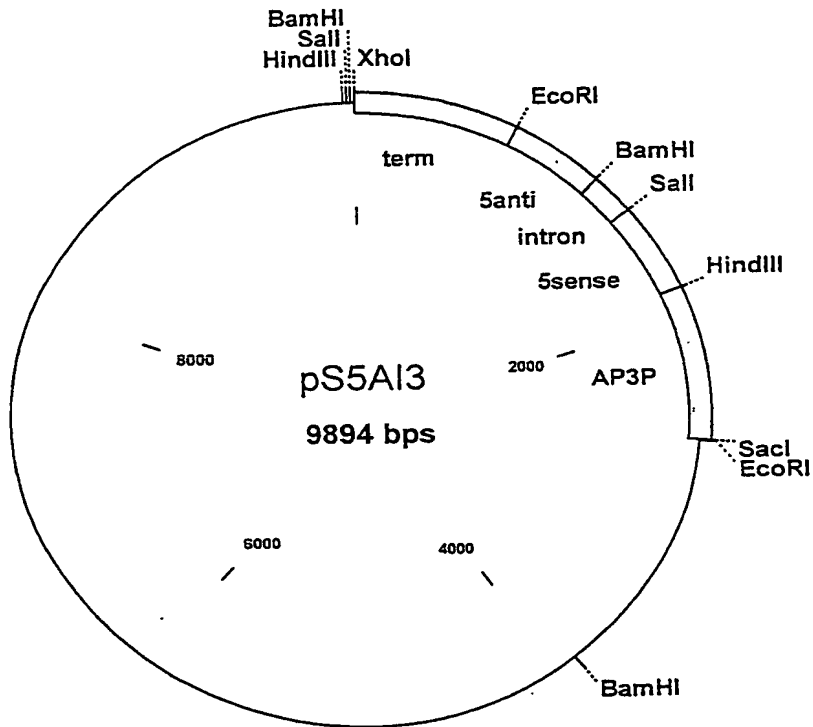




Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-PRomoters

5

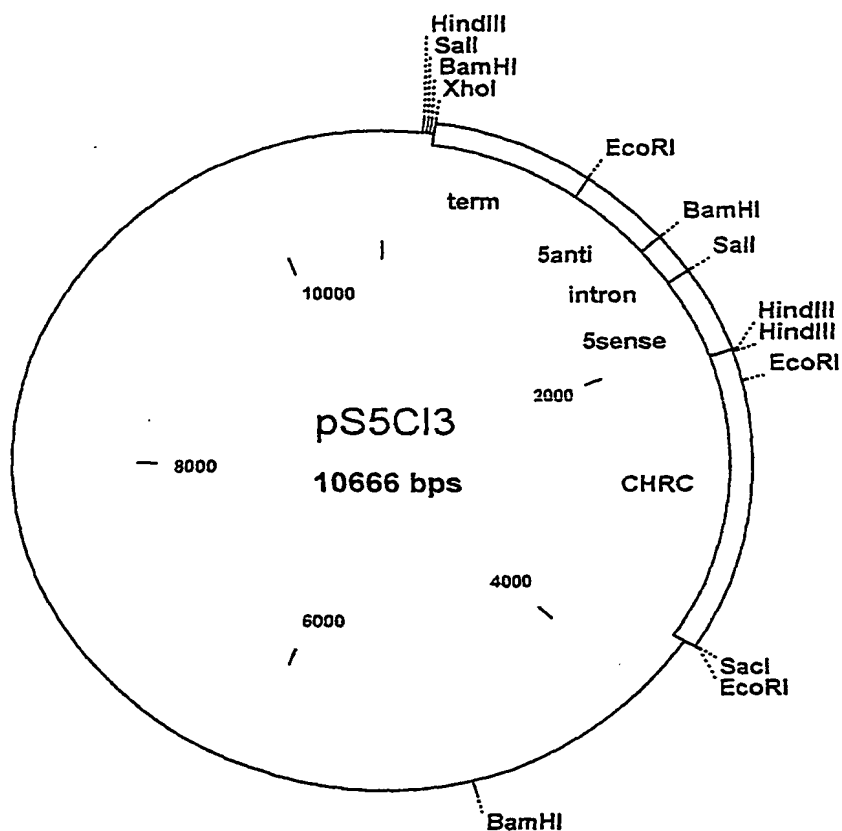


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen  
Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend  
3'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA  
(AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

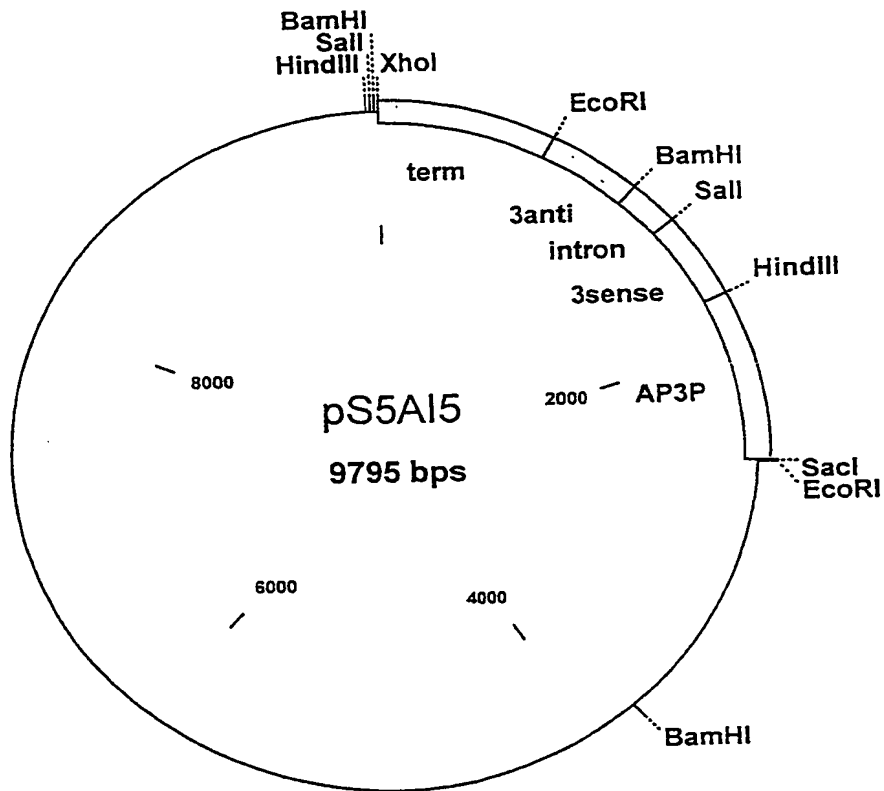


Abbildung 11: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

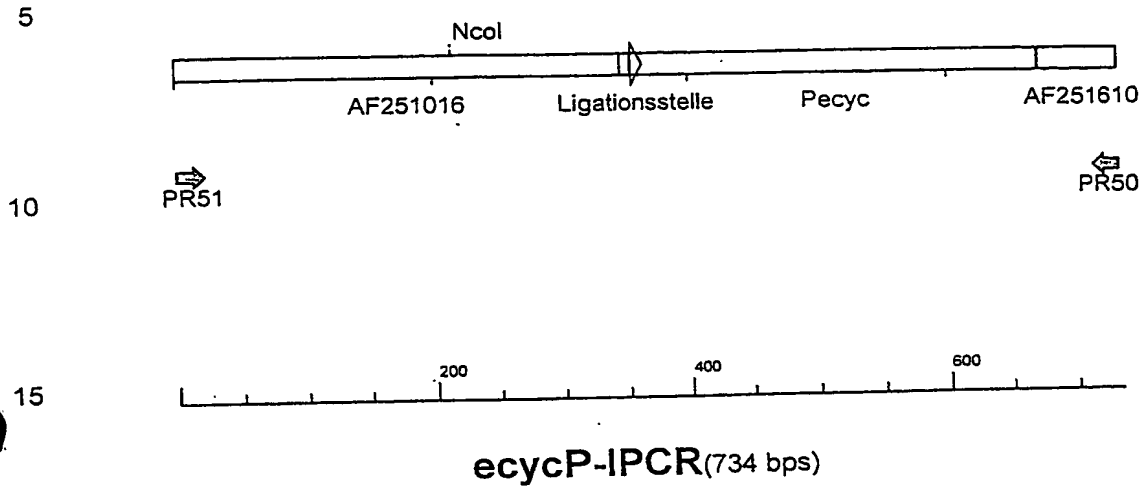


Abbildung 12: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment  
des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

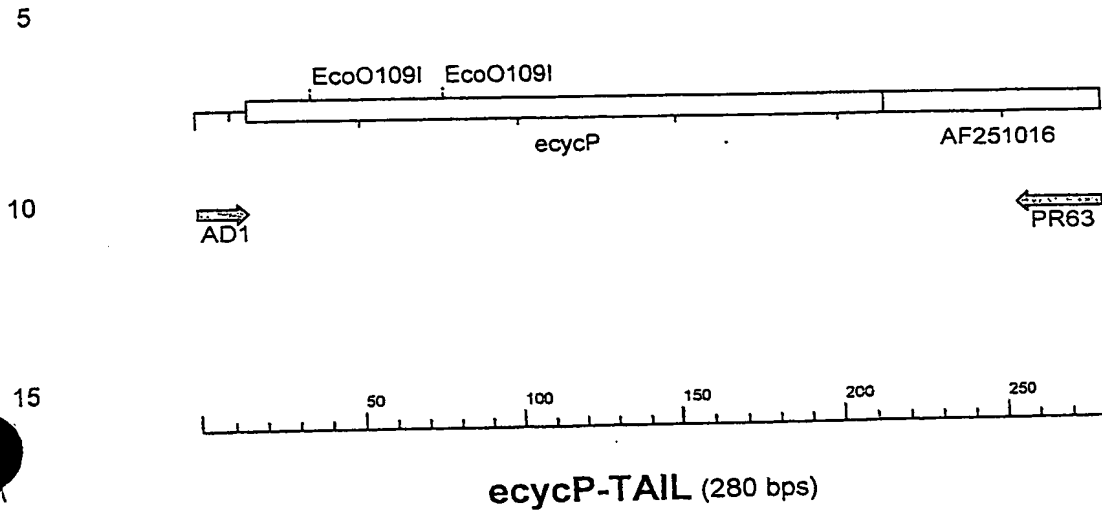


Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenesspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

10

15

20

25

30

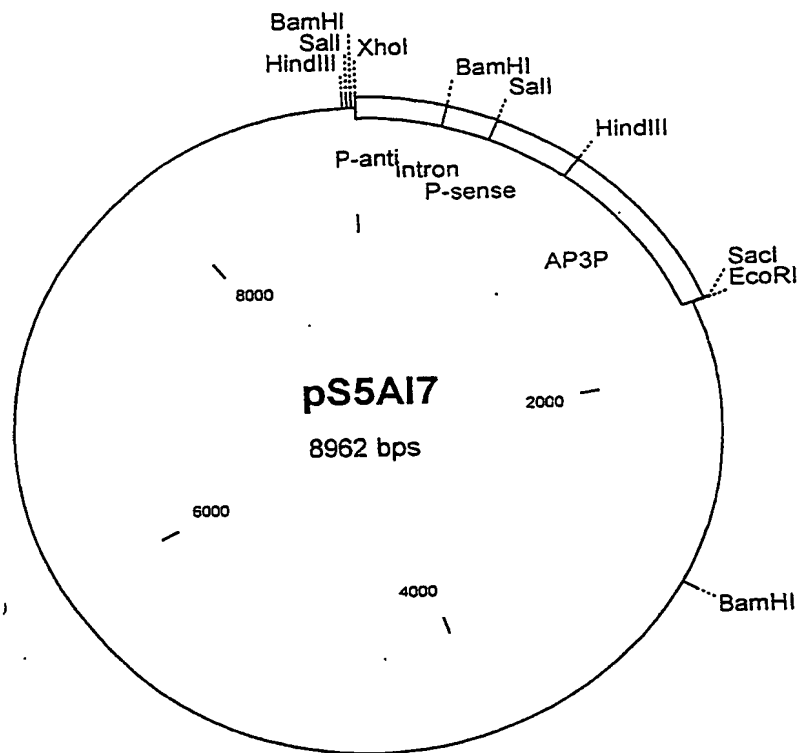


Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

5

10

15

20

25

30

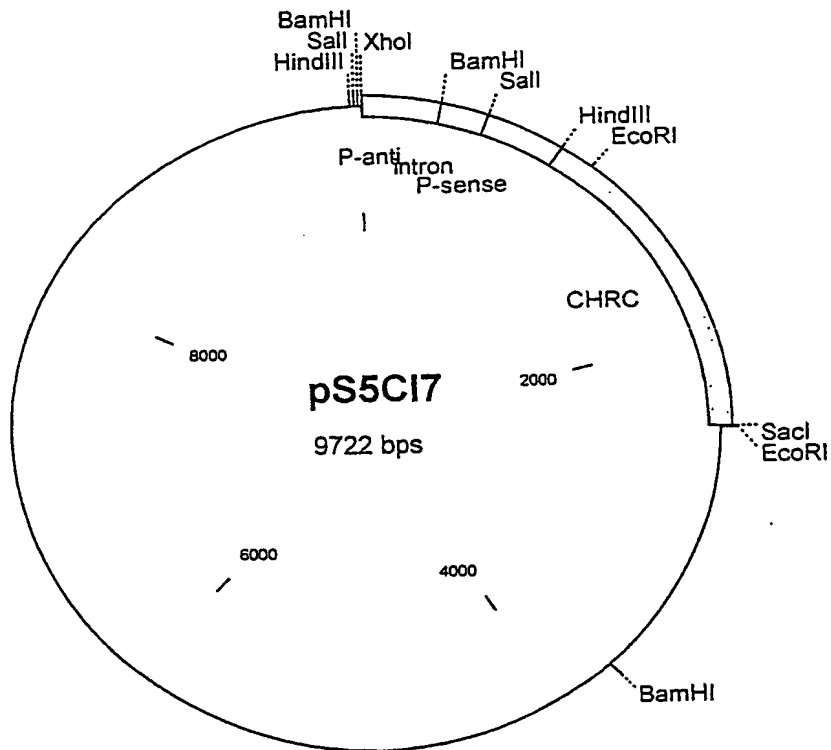
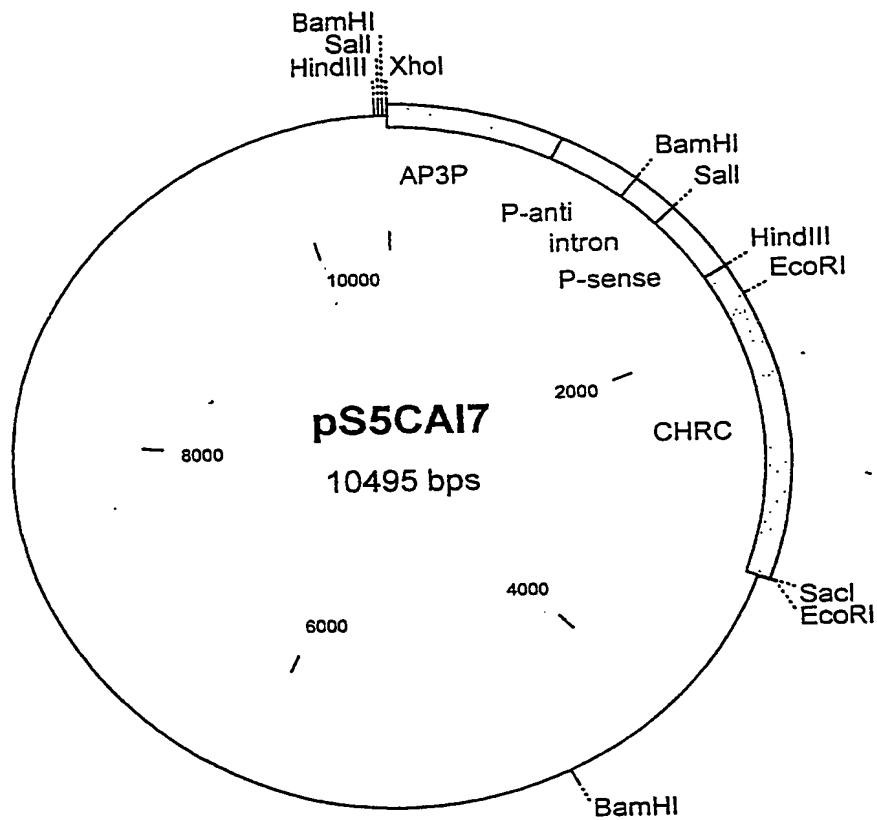


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp 5' Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

#### Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmentierter Tiere und Tierprodukte.

10



Fischfutter.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH Co. KGaA

<120> Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

<130> PF 54148

<160> 96

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1155)

<223>

<400> 1  
ggcagagct tgcacgcaag tcagcgcgcg caagtcaaca cctgccggtc cacagcctca 60  
aataataaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac 120  
ccgcgagtct cccgccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca 177  
Met Gln Leu Ala  
1  
gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag 225  
Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys  
5 10 15 20  
gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg 273  
Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp  
25 30 35  
gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg 321  
Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro  
40 45 50  
gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc 369  
Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile

## Fischfutter.ST25.txt

55	60	65	
aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala Val Phe Leu His 70 75 80			417
gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg gac cag ctg cac tgg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp Gln Leu His Trp 85 90 95 100			465
ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt agc ggc acg agc agc Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser Gly Thr Ser Ser 105 110 115			513
ctg ctc gac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg gag ttc ctg tac aca Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr 120 125 130			561
ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat ggc acc atc gcc atg Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Met 135 140 145			609
a aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga gta tgc atc tcc ttg g Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val Cys Ile Ser Leu 150 155 160			657
tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc aag cat tgg gag cac Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His 165 170 175 180			705
cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct gac ttc cac agg gga His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Arg Gly 185 190 195			753
aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc atg tcc agc tac atg Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met 200 205 210			801
tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg acg gtg gtc atg cag Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr Val Val Met Gln 215 220 225			849
ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala 230 235 240			897
ctc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt ggc acg tac atg ccc Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro 245 250 255 260			945
cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct tca cca gcc gtc atg His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser Pro Ala Val Met 265 270 275			993
aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc gac ctg gtc agc ttt Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe 280 285 290			1041
ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag cac cac cgc tgg ccc Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro 295 300 305			1089
ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg 310 315 320			1137
ggc ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgcca Gly Leu Val Pro Ala			1185

Fischfutter.ST25.txt

325

gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccg 1245  
gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggagggggg tttgtagctg 1305  
tcgagcttgc cccatggatg aagctgtgta gtggtgcagg gactacaccc acaggccaac 1365  
acccttgcag gagatgtctt gcgtcgggag gagtggtggg cagtgtagat gctatgattg 1425  
tatcttaatg ctgaagcctt taggggagcg acacttagtg ctgggcaggc aacgccctgc 1485  
aaggtgcagg cacaagctag gctggacgag gactcgggtg caggcagggtg aagaggtgcg 1545  
ggaggggtgg gccacaccca ctgggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagtg 1605  
agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gtttgagcag tctcacttat tctttgatat 1665  
agatactggt caggcagggtc aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgctgc 1725  
ccctgcgctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 1771

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
100 105 110

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
Seite 3

130

135

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

<210> 3

<211> 1662

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (168)..(1130)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 3  
cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgcgcccc agcctcacag cgccaagtga 60  
gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cgggcctgtg agcctctgcg 120  
ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgggg cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc 176  
Met His Val  
1  
gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc 224  
Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser  
5 10 15  
agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc 272  
Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser  
20 25 30 35  
gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct 320  
Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro  
40 45 50  
cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc 368  
Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly  
55 60 65  
acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg 416  
Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro  
70 75 80  
aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc 464  
Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala  
85 90 95  
cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc 512  
Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe  
100 105 110 115  
att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac 560  
Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp  
120 125 130  
gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc 608  
Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu  
135 140 145  
ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg 656  
Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met  
150 155 160  
ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg 704  
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly  
165 170 175  
aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc 752  
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe  
180 185 190 195  
gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg 800  
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu  
200 205 210  
gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat 848  
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn  
215 220 225

## Fischfutter.ST25.txt

ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc 896  
 Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu  
 230 235 240

ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca 944  
 Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala  
 245 250 255

gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca 992  
 Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala  
 260 265 270 275

tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg 1040  
 Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 280 285 290

gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc 1088  
 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys  
 295 300 305

cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga 1130  
 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 310 315 320

ctggtccct ccgctggtga cccagcgtct gcacaagagt gtcattgctac aggggtgctgc 1190

ggccagtggc agcgcagtgc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca 1250

ctgggcatgc cactgagcac tgggcgtgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg 1310

ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggctagga tggagtttga 1370

tgcattcagt agcgggtggc aacgtcatgt ggatgggtgga agtgctgagg ggtttaggca 1430

gccggcattt gagaggggcta agttataaat cgcattgctgc tcatgcgcac atatctgcac 1490

acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atgggacact tgtattgggt tcgtgctatt 1550

gttttattca gcagcagtac ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgagt 1610

gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct 1662

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His  
 20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala  
 35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr

50

55

Fischfutter.ST25.txt  
60

Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile  
65 70 75 80

Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu  
85 90 95

Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala  
100 105 110

Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr  
115 120 125

Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu  
130 135 140

Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp  
145 150 155 160

Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly  
165 170 175

Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val  
180 185 190

Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe  
195 200 205

Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro  
210 215 220

Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala  
225 230 235 240

Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro  
245 250 255

Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr  
260 265 270

Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp  
275 280 285

Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu  
290 295 300

Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
305 310 315 320

—

<211> 729

<212> DNA

<213> Agrobacterium aurantiacum

**<220>**

<221> CDS

<222> (1) .. (729)

<223>

[illegible]



Fischfutter.ST25.txt

gac cgc cac aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac ccc gtg tcg ctg 624  
 Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
 195 200 205

ctg acc tgc ttt cac ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac 672  
 Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
 210 215 220

ccg acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac 720  
 Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
 225 230 235 240

acc gca tga 729  
 Thr Ala

<210> 6

<211> 242

<212> PRT

<213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 6

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
 1 5 10 15

Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
 20 25 30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala  
 35 40 45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
 115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Fischfutter.ST25.txt

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe ~  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7

<211> 1631

<212> DNA

<213> Alcaligenes sp.

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(827)

<223>

<400> 7

gcaggccg ggcccgggtgg ccaatgggtcg caaccggcag gactggaaca ggacggcggg 60

ccgggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116  
Met Ser Gly Arg Lys Pro  
1 5

ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164  
Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile  
10 15 20

ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212  
Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp  
25 30 35

gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260  
Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr  
40 45 50

tgg ctg tgc gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308  
Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly  
55 60 65 70

## Fischfutter.ST25.txt

tcc gtg gtg ccg ggg cgg ccg cgc gcc aat gcg gcg atc ggg caa ctg	356
Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn Ala Ala Ile Gly Gln Leu	
75 80 85	
gcg ctg tgg ctc tat gcg ggg ttc tcg tgg ccc aag ctg atc gcc aag	404
Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp Pro Lys Leu Ile Ala Lys	
90 95 100	
cac atg acg cat cac cgg cac gcc ggc acc gac aac gat ccc gat ttc	452
His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr Asp Asn Asp Pro Asp Phe	
105 110 115	
ggc cac gga ggg ccc gtg cgc tgg tac ggc agc ttc gtc tcc acc tat	500
Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly Ser Phe Val Ser Thr Tyr	
120 125 130	
ttc ggc tgg cga gag gga ctg ctg cta ccg gtg atc gtc acc acc tat	548
Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro Val Ile Val Thr Thr Tyr	
135 140 145 150	
gcg ctg atc ctg ggc gat cgc tgg atg tat gtc atc ttc tgg ccg gtc	596
Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr Val Ile Phe Trp Pro Val	
155 160 165	
ccg gcc gtt ctg gcg tcg atc cag att ttc gtc ttc gga act tgg ctg	644
Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe Val Phe Gly Thr Trp Leu	
170 175 180	
ccc cac cgc ccg gga cat gac gat ttt ccc gac cgg cac aac gcg agg	692
Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro Asp Arg His Asn Ala Arg	
185 190 195	
tcg acc ggc atc ggc gac ccg ttg tca cta ctg acc tgc ttc cat ttc	740
Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu Leu Thr Cys Phe His Phe	
200 205 210	
ggc ggc tat cac cac gaa cat cac ctg cat ccg cat gtg ccg tgg tgg	788
Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His Pro His Val Pro Trp Trp	
215 220 225 230	
cgc ctg cct cgt aca cgc aag acc gga ggc cgc gca tga cgcaattcct	837
Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly Arg Ala	
235 240	
tattgtcgtg gcgacagtcc tcgtgatgga gctgaccgcc tattccgtcc accgctggat	897
atgcacggc cccctaggct ggggctggca caagtcccat cacgaagagc acgaccacgc	957
gttgaggagaag aacgacctct acggcgctcgt cttcgcggtg ctggcgacga tcctcttcac	1017
cgtgggcgcc tattggtggc cgggtgctgtg gtggatcgcc ctgggcatga cggcttatgg	1077
gttgatctat ttcacctgc acgacgggct tgtgcatcaa cgctggccgt ttcggtatat	1137
tccgcggcgg ggctatttcc gcaggctcta ccaagctcat cgcctgcacc acgcggctga	1197
ggggcgggac cactgcgtca gcttcggctt catctatgcc ccaccgtgg acaagctgaa	1257
gcaggatctg aagcggctcg gtgtcctgcg cccccaggac gagcgtccgt cgtgatctct	1317
gatcccgcg tggccgcatg aaatccgacg tgcgtgctggc aggggcccggc cttgccaacg	1377
gactgatcgc gctggcgatc cgcaaggcgc ggcccgaacct tcgctgctg ctgctggacc	1437
gtgcggcggg cgcctcggac gggcatactt ggtcctgcc cgacaccgat ttggcgccgc	1497
actggctgga ccgcctgaag ccgatcaggc gtggcgactg gccgatcag gaggtgcggt	1557

## Fischfutter.ST25.txt

tcccagacca ttcgcaagg ctccgggccg gatatggctc gatcgacggg cgggggctga 1617  
 tgcgtgcggt gacc 1631

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Alcaligenes sp.

<400> 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu  
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe  
 20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu  
 35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
 50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
 65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
 85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr  
 100 105 110

Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly  
 115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
 130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
 145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe  
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro  
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu  
 195 200 205

Fischfutter.ST25.txt

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro His Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Arg Thr Arg Lys Thr Gly Gly  
225 230 235 240

Arg Ala

<210> 9

<211> 729

<212> DNA

<213> Paracoccus marcusii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 9

atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc aca agc ctg 48  
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu  
1 5 10 15

atc gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gca tgg ctg gcc ctg cat gtg cat 96  
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His  
20 25 30

gcg ctg tgg ttt ctg gac gcg gcg gcc cat ccc atc ctg gcg gtc gcg 144  
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala  
35 40 45

cat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gcg 192  
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala  
50 55 60

cat gac gcg atg cac ggg tcg gtc gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat 240  
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn  
65 70 75 80

gcg gcg atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg 288  
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp  
85 90 95

cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc 336  
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr  
100 105 110

gac gac gac cca gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc 384  
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggc ctg ctg ctg ccc 432  
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro

Fischfutter.ST25.txt

130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat gcg ctg atc ctg ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160			480
gtg gtc ttc tgg ccg ttg ccg tcg atc ctg gcg tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175			528
gtg ttc ggc act tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gcg ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190			576
gac cgc cat aat gcg cgg tcg tcg cgg atc agc gac cct gtg tcg ctg Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu 195 200 205			624
ctg acc tgc ttt cat ttt ggc ggt tat cat cac gaa cac cac ctg cac Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His 210 215 220			672
g acg gtg ccg tgg tgg cgc ctg ccc agc acc cgc acc aag ggg gac Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp 230 235 240			720
acc gca tga Thr Ala			729

<210> 10  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> Paracoccus marcusii

<400> 10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu 1 5 10 15
Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His 20 25 30
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala 35 40 45
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala 50 55 60
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn 65 70 75 80
Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp 85 90 95
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr

Fischfutter.ST25.txt

100

105

110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala  
115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro  
130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr  
145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe  
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro  
180 185 190

Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu  
195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His  
210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp  
225 230 235 240

Thr Ala

<210> 11

<211> 1629

<212> DNA

<213> Synechococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1629)

<223>

<400> 11

atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta  
Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
1 5 10 15

48

gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta  
Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
20 25 30

96

## Fischfutter.ST25.txt

gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg -	144
Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met	
35 40 45	
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac	192
Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His	
50 55 60	
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag	240
Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln	
65 70 75 80	
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg	288
Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly	
85 90 95	
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt	336
Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys	
100 105 110	
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa	384
Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln	
115 120 125	
gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt	432
Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe	
130 135 140	
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg	480
Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp	
145 150 155 160	
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg	528
Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala	
165 170 175	
ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat	576
Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn	
180 185 190	
gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt	624
Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys	
195 200 205	
tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg	672
Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met	
210 215 220	
atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga	720
Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly	
225 230 235 240	
ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa	768
Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln	
245 250 255	
ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa	816
Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu	
260 265 270	
aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac ccg	864
Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg	
275 280 285	
gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg	912
Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu	
290 295 300	



## Fischfutter.ST25.txt

caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg 960  
 Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
 305 310 315 320

gaa cga ctg gaa cgg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa 1008  
 Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
 325 330 335

atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg 1056  
 Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
 340 345 350

ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat 1104  
 Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
 355 360 365

gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct 1152  
 Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
 370 375 380

aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg 1200  
 Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
 385 390 395 400

gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac 1248  
 Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
 405 410 415

cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc 1296  
 Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
 420 425 430

gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg 1344  
 Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
 435 440 445

gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa 1392  
 Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
 450 455 460

agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc 1440  
 Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
 465 470 475 480

tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta 1488  
 Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
 485 490 495

ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca 1536  
 Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
 500 505 510

ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga 1584  
 Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
 515 520 525

aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa 1629  
 Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
 530 535 540

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 542

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Synechococcus sp.

Fischfutter.ST25.txt

<400> 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu  
1 5 10 15

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu  
20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met  
35 40 45

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His  
50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln  
70 75 80

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly  
85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys  
100 105 110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln  
115 120 125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe  
130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp  
145 150 155 160

Leu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala  
165 170 175

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn  
180 185 190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys  
195 200 205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met  
210 215 220

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly  
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln  
245 250 255

Fischfutter.ST25.txt

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu  
260 265 270

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg  
275 280 285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu  
290 295 300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly  
305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys  
325 330 335

Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly  
340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His  
355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala  
370 375 380

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met  
385 390 395 400

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr  
405 410 415

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr  
420 425 430

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr  
435 440 445

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu  
450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val  
465 470 475 480

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu  
485 490 495

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr  
500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg  
515 520 525

Fischfutter.ST25.txt

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp  
530 535 540

<210> 13

<211> 776

<212> DNA

<213> Bradyrhizobium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<223>

<400> 13

atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc 48  
Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg  
1 5 10 15

gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc 96  
Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
20 25 30

atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg 144  
Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
35 40 45

ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag 192  
Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
50 55 60

acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac 240  
Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
65 70 75 80

ctc tgc ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag 288  
Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
85 90 95

ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc 336  
Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
100 105 110

gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat 384  
Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
115 120 125

ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt 432  
Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
130 135 140

ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc 480  
Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
145 150 155 160

tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg 528  
Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu

## Fischfutter.ST25.txt

165

170

175

ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tgc gcg ctg cag ctg ttc acc  
 Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
 180 185 190

576

ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat  
 Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
 195 200 205

624

cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tgc ctg ctg  
 Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
 210 215 220

672

acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat  
 Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
 225 230 235 240

720

gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg  
 Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
 245 250 255

768

ggt gac ta  
 Asp

776

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bradyrhizobium sp.

&lt;400&gt; 14

Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg  
 1 5 10 15

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile  
 20 25 30

Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro  
 35 40 45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln  
 50 55 60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His  
 65 70 75 80

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln  
 85 90 95

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val  
 100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp  
 Seite 21

115

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe  
130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val  
145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu  
165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr  
180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp  
195 200 205

Gly His Asn Ala Arg Thr Ser Gly Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu  
210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp  
225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg  
245 250 255

Arg Asp

<210> 15

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 15  
atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta  
Met Val Gln Cys 5 Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
1 10 15

48

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt  
Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
20 25 30

96

## Fischfutter.ST25.txt

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta 144  
 Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu-  
 35 40 45  
 ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc 192  
 Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
 50 55 60  
 atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat 240  
 Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
 65 70 75 80  
 gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat 288  
 Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
 85 90 95  
 ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa 336  
 Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
 100 105 110  
 gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat 384  
 Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
 115 120 125  
 gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg 432  
 Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
 130 135 140  
 tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga 480  
 Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
 145 150 155 160  
 tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa 528  
 Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
 165 170 175  
 aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta 576  
 Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
 180 185 190  
 caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt 624  
 Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
 195 200 205  
 ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt 672  
 Tyr Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
 210 215 220  
 tgg tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac 720  
 Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
 225 230 235 240  
 gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata 768  
 Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
 245 250 255  
 tct tta taa 777  
 Ser Leu

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nostoc sp.

Fischfutter.ST25.txt

<400> 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu  
1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe  
20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu  
35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala  
50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His  
65 70 75 80

Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn  
85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys  
100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp  
115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp  
130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly  
145 150 155 160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu  
165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val  
180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly  
195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe  
210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His  
225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile  
245 250 255



Fischfutter.ST25.txt

Ser Leu

<210> 17

<211> 1608

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(971)

<223>

100> 17 47  
 ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc  
 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile  
 1 5 10 15  
 ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95  
 Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu  
 20 25 30  
 tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143  
 Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala  
 35 40 45  
 cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191  
 Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser  
 50 55 60  
 tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga 239  
 Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly  
 65 70 75  
 gtg cag gct gcc ggc ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca 287  
 Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala  
 80 85 90 95  
 ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa 335  
 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys  
 100 105 110  
 cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc 383  
 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly  
 115 120 125  
 gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac 431  
 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His  
 130 135 140  
 atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc 479  
 Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu  
 145 150 155  
 ctc ttg gtg gtt ggt ggc ggc ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat 527  
 Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr

## Fischfutter.ST25.txt

160	165	170	175	
gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac				575
Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His	180	185	190	
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg				623
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu	195	200	205	
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc				671
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly	210	215	220	
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg				719
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu	225	230	235	
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg				767
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu	240	245	250	255
ctg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg				815
His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met	260	265	270	
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt				863
Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly	275	280	285	
ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att				911
Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile	290	295	300	
cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg				959
Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp	305	310	315	
tcc aag cgg tag ggtgcggaac caggcacgct ggtttcacac ctcatgcctg				1011
Ser Lys Arg	320			
tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actggtctga				1071
tggccaatgg catcggccat gtctgggtcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg				1131
atcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc				1191
ggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcgggt tgtgaagcaa tgactccgcc				1251
catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcatg gatcatggta				1311
gtgcagcaaa ctatattcac ctagggctgt tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg				1371
catgatgtac tcgtcatggt gtgttggtga gaggatggat gtggatggat gtgtattctc				1431
agacgtagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga				1491
ggctcgtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcagggtgaga				1551
tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa				1608

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt; PRT

Fischfutter.ST25.txt

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 18

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
50 55 60

Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
85 90 95

Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
115 120 125

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
130 135 140

Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
145 150 155 160

Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
165 170 175

His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
195 200 205

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
210 215 220

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
225 230 235 240

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val

245

250

255

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320

Lys Arg

&lt;10&gt; 19

&lt;11&gt; 1503

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tomate

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1503)

&lt;223&gt;

<400> 19  
 atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca 48  
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro 15

ttt cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat 96  
 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His 30

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt 144  
 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val 45

tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc 192  
 Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr 60

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa 240  
 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys 70 75 80

ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt 288  
 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu 85 90 95

## Fischfutter.ST25.txt

gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgt tca att Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile 100 105 110	336
gat ccg aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val 115 120 125	384
gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgt cta gat gct acc tgg Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp 130 135 140	432
tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His 145 150 155 160	480
aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met 165 170 175	528
cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile 180 185 190	576
gat gtt att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly 195 200 205	624
att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg 210 215 220	672
tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala 225 230 235 240	720
tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys 245 250 255	768
atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp 260 265 270	816
ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro 275 280 285	864
ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg 290 295 300	912
cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu 305 310 315 320	960
aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys 325 330 335	1008
cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val 340 345 350	1056
gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met 355 360 365	1104

Fischfutter.ST25.txt

gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile 370 375 380	1152
caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr 385 390 395 400	1200
gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu 405 410 415	1248
ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala 420 425 430	1296
aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp 435 440 445	1344
cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe 450 455 460	1392
ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata Val Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile 465 470 475 480	1440
atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu 485 490 495	1488
cag gat aaa gaa tga Gln Asp Lys Glu 500	1503

<210> 20  
<211> 500  
<212> PRT  
<213> Tomate

<210> 20

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro 1 5 10 15
His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His 20 25 30
His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val 35 40 45
Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr 50 55 60
Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys 65 70 75 80

Fischfutter.ST25.txt

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu-  
85 90 95

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile  
100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val  
115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp  
130 135 140

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His  
145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met  
165 170 175

Asn Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile  
180 185 190

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly  
195 200 205

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg  
210 215 220

Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala  
225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys  
245 250 255

Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp  
260 265 270

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
275 280 285

Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg  
290 295 300

Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu  
305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys  
325 330 335

Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val  
340 345 350

Fischfutter.ST25.txt

Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met  
355 360 365

Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile  
370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr  
385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu  
405 410 415

Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala  
420 425 430

Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp  
435 440 445

His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe  
450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile  
465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu  
485 490 495

Gln Asp Lys Glu  
500

<210> 21

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 21  
tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60  
atataatatt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120  
ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180



gttgatgtgc agctg

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 1155

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (6)..(995)

&lt;223&gt;

100> 22  
 agc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50  
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser 15  
 1 5 10

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98  
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp 30  
 20 25

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146  
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser 45  
 35 40

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194  
 Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser 60  
 50 55

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc 242  
 Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala 75  
 65 70

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290  
 Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu 95  
 85 90

gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt 338  
 Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val 110  
 100 105

agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg 386  
 Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu 125  
 115 120

gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat 434  
 Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His 140  
 130 135

ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga 482  
 Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg 155  
 145 150

gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc 530  
 Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg 175  
 160 165 170

## Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578  
Lys His Trp Glu His 180 His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro 190  
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626  
Asp Phe His Arg 195 Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe 205  
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674  
Met Ser Ser 210 Tyr Met Ser Met Trp 215 Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp 220  
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722  
Thr Val Val Met Gln Leu 230 Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val 235  
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770  
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe 240 245 250 255  
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818  
Gly Thr Tyr Met Pro 260 His Lys Pro Glu Pro 265 Gly Ala Ala Ser Gly Ser 270  
a cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866  
Ser Pro Ala Val 275 Met Asn Trp Trp Lys 280 Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser 285  
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
Asp Leu Val 290 Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu 300  
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
His His Arg Trp Pro Phe 310 Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg 315  
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc 1015  
Arg Leu Ser Gly Arg 325 Gly Leu Val Pro Ala  
cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggg 1075  
gctgctgccg gacacgctgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg 1135  
tttgtagctg tcgagcttgc 1155

&lt;10&gt; 23

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;400&gt; 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp

35

Fischfutter.ST25.txt  
40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
115 120 125

Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
Seite 35

305

310

315

320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
325

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 1111

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (4)..(951)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 24

tgc	atg	cta	gag	gca	ctc	aag	gag	aag	gag	aag	gag	gtt	gca	ggc	agc	48
Met	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Ser		
1				5				10						15		

tct	gac	gtg	ttg	cgt	aca	tgg	gcg	acc	cag	tac	tcg	ctt	ccg	tca	gaa	96
Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	Trp	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	
			20					25						30		

gag	tca	gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	aat	gcc	tac	aag	cca	cca	144
Glu	Ser	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	
			35				40						45			

cct	tcc	gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	192
Pro	Ser	Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	
		50				55					60					

tgg	gcc	gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	240
Trp	Ala	Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	
65				70						75						

tcc	ttg	gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	tca	gat	gcc	aca	gct	cag	288
Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	
80				85					90					95		

ctg	gtt	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	336
Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	
			100						105					110		

gtc	ctg	gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	atc	acc	acg	cat	gat	gct	384
Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	
			115					120					125			

atg	cat	ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	432
Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	
		130					135					140				

ggc	aga	gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	480
Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	
	145					150					155					

Fischfutter.ST25.txt

cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys 160 165 170 175	528
gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala 180 185 190	576
agc ttc atg tcc agc tac atg tgc atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala 195 200 205	624
tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu 210 215 220	672
ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe 225 230 235	720
tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser 240 245 250 255	768
tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag Gly Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln 260 265 270	816
gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His 275 280 285	864
tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn 290 295 300	912
tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala 305 310 315	961
tcgactgggc cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa	1021
agctgcaggc gctgctgccg gacacgttgc atgggctacc ctgtgtagct gccgccacta	1081
ggggagggggg tttgtagctg tcgagcttgc	1111

<10> 25

<211> 315

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser  
1 5 10 15

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu  
20 25 30

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro  
Seite 37

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp  
50 55 60

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser  
65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu  
85 90 95

Val Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val  
100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met  
115 120 125

S Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly  
130 135 140

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His  
145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp  
165 170 175

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser  
180 185 190

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp  
195 200 205

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu  
210 215 220

1 Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr  
225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly  
245 250 255

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala  
260 265 270

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys  
290 295 300

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
Seite 38

305

310

<210> 26

<211> 1031

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (6)..(1031)

<223>

100> 26

atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc  
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser  
1 5 10 15

50

gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac  
Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp  
20 25 30

98

gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca  
Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser  
35 40 45

146

gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc  
Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser  
50 55 60

194

gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct  
Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala  
65 70 75

242

gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg  
Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu  
85 90 95

290

gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt  
Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val  
100 105 110

338

agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg  
Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu  
115 120 125

386

gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat  
Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His  
130 135 140

434

ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga  
Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg  
145 150 155

482

gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc  
Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg  
160 165 170 175

530

Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct 578  
 Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro  
 180 185 190

gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc 626  
 Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe  
 195 200 205

atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg 674  
 Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp  
 210 215 220

acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg 722  
 Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val  
 225 230 235

ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt 770  
 Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe  
 240 245 250 255

ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct 818  
 Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser  
 260 265 270

a cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc 866  
 er Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser  
 275 280 285

gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag 914  
 Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
 290 295 300

cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc 962  
 His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg  
 305 310 315

cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca 1010  
 Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
 320 325 330 335

gaa gag gat ctg aat agc tag 1031  
 Glu Glu Asp Leu Asn Ser  
 340

<210> 27

<11> 341

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45



Fischfutter.ST25.txt

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
210 215 220

Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
305 310 315 320

Fischfutter.ST25.txt

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 325 330 335

Glu Asp Leu Asn Ser  
 340

<210> 28

<211> 777

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 28	
gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt	60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga	120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga	180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta	240
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgta	300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca	360
tatatatctc tttcttctta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta	420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca	480
aaagccaac caaatccacc tgacttgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt	540
cggttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta	600
tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt	660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact	720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaatc tcttcaacaa aaagctt	777

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

Fischfutter.ST25.txt

<221> primer\_bind

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 29  
gcaagctcga cagctacaaa cc

22

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> kuenstlich

<20>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 30  
gaagcatgca gctagcagcg acag

24

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

<20>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 31  
tgcatgctag aggcaactcaa ggagaaggag

30

<210> 32

<211> 59

<212> DNA

<213> kuenstlich

Fischfutter.ST25.txt

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(59)

<223>

<400> 32  
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag tttttgctcg gcaggaacca gacctcggc 59

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 33  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 34

<211> 37

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 34  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 35

<211> 34

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 35  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 36  
taagcttttt gttgaagaga tttag

25

<210> 37

<211> 212

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(212)

<223>

<400> 37  
gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta

60

## Fischfutter.ST25.txt

gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120  
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180  
aaatttgttg atgtgcaggt atcaccggat cc 212

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 1830

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (141)..(1691)

&lt;223&gt;

<400> 38  
ggcagcaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgtttgttga gagacactcc aatccaaaca 60

gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120

agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173  
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr  
1 5 10

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221  
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr  
15 20 25

aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269  
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln  
30 35 40

gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg 317  
Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu  
45 50 55

ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc 365  
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser  
60 65 70 75

cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt 413  
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser  
80 85 90

aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt 461  
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu  
95 100 105

gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc 509  
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile  
110 115 120

ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa 557  
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu  
125 130 135

## Fischfutter.ST25.txt

ttt Phe 140	ata Ile	ggt Gly	ctt Leu	gga Gly	ctt Leu 145	gag Glu	ggc Gly	tgt Cys	att Ile	gaa Glu 150	cat His	ggt Val	tgg Trp	cga Arg	gat Asp 155	605
act Thr	gta Val	gta Val	tat Tyr 160	ctt Leu 160	gat Asp	gac Asp	aac Asn	gat Asp	ccc Pro 165	att Ile	ctc Leu	ata Ile	ggt Gly 170	cgt Arg	gcc Ala	653
tat Tyr	gga Gly	cga Arg	gtt Val 175	agt Ser	cgt Arg	gat Asp	tta Leu	ctt Leu 180	cac His	gag Glu	gag Glu	ttg Leu	ttg Leu 185	act Thr	agg Arg	701
tgc Cys	atg Met	gag Glu 190	tca Ser	ggc Gly	gtt Val	tca Ser	tat Tyr 195	ctg Leu	agc Ser	tcc Ser	aaa Lys	gtg Val 200	gaa Glu	cgg Arg	att Ile	749
act Thr	gaa Glu 205	gct Ala	cca Pro	aat Asn	ggc Gly	cta Leu 210	agt Ser	ctc Leu	ata Ile	gag Glu	tgt Cys 215	gaa Glu	ggc Gly	aat Asn	atc Ile	797
aca Thr 220	att Ile	cca Pro	tgc Cys	agg Arg	ctt Leu 225	gct Ala	act Thr	gtc Val	gct Ala	tct Ser 230	gga Gly	gca Ala	gct Ala	tct Ser	gga Gly 235	845
aca Lys	ctt Leu	ttg Leu	cag Gln 240	tat Tyr	gaa Glu	ctt Leu	ggc Gly	ggt Gly	ccc Pro 245	cgt Arg	gtt Val	tgc Cys	gtt Val	caa Gln 250	aca Thr	893
gct Ala	tat Tyr	ggt Gly	ata Ile 255	gag Glu	gtt Val	gag Glu	gtt Val	gaa Glu 260	agc Ser	ata Ile	ccc Pro	tat Tyr	gat Asp 265	cca Pro	agc Ser	941
cta Leu	atg Met	gtt Val 270	ttc Phe	atg Met	gat Asp	tat Tyr	aga Arg 275	gac Asp	tac Tyr	acc Thr	aaa Lys	cat His 280	aaa Lys	tct Ser	caa Gln	989
tca Ser	cta Leu 285	gaa Glu	gca Ala	caa Gln	tat Tyr	cca Pro 290	aca Thr	ttt Phe	ttg Leu	tat Tyr	gtc Val 295	atg Met	cca Pro	atg Met	tct Ser	1037
cca Pro 300	act Thr	aaa Lys	gta Val	ttc Phe	ttt Phe 305	gag Glu	gaa Glu	act Thr	tgt Cys	ttg Leu 310	gct Ala	tca Ser	aaa Lys	gag Glu	gcc Ala 315	1085
atg Met	cct Pro	ttt Phe	gag Glu	tta Leu 320	ttg Leu	aag Lys	aca Thr	aaa Lys	ctc Leu 325	atg Met	tca Ser	aga Arg	tta Leu	aag Lys 330	act Thr	1133
atg Met	ggg Gly	atc Ile	cga Arg 335	ata Ile	acc Thr	aaa Lys	act Thr	tat Tyr 340	gaa Glu	gag Glu	gaa Glu	tgg Trp	tca Ser 345	tat Tyr	att Ile	1181
cca Pro	gta Val	ggt Gly 350	gga Gly	tcc Ser	tta Leu	cca Pro	aat Asn 355	acc Thr	gag Glu	caa Gln	aag Lys	aac Asn 360	ctt Leu	gca Ala	ttt Phe	1229
ggt Gly	gct Ala	gct Ala	gct Ala	agc Ser	atg Met	gtg Val 370	cat His	cca Pro	gcc Ala	aca Thr	gga Gly 375	tat Tyr	tcg Ser	gtt Val	gta Val	1277
aga Arg 380	tca Ser	ctg Leu	tca Ser	gaa Glu	gct Ala 385	cct Pro	aat Asn	tat Tyr	gca Ala	gca Ala 390	gta Val	att Ile	gca Ala	aag Lys	att Ile 395	1325
tta Leu	ggg Gly	aaa Lys	gga Gly	aat Asn 400	tca Ser	aaa Lys	cag Gln	atg Met	ctt Leu 405	gat Asp	cat His	gga Gly	aga Arg	tac Tyr 410	aca Thr	1373

## Fischfutter.ST25.txt

acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg 1421  
 Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg  
 415 420 425

aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag 1469  
 Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln  
 430 435 440

atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517  
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu  
 445 450 455

ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tct tta tca tca act 1565  
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr  
 460 465 470 475

gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613  
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser  
 480 485 490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661  
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly  
 495 500 505

aa atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcgatcag 1711  
 Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 510 515

tttagattat aggcacatct tgcataatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771

tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg 1830

<210> 39

<211> 516

<212> PRT

<213> Tagetes erecta

<400> 39

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 5 10 15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
 50 55 60

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
 65 70 75 80

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
 85 90 95



Fischfutter.ST25.txt

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu-  
100 105 110

Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
115 120 125

Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
130 135 140

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
145 150 155 160

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
180 185 190

Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
210 215 220

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
225 230 235 240

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
325 330 335

Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
340 345 350

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
355 360 365

Fischfutter.ST25.txt

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
450 455 460

Phe Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
500 505 510

Tyr Leu Thr Ile  
515

<210> 40

<211> 445

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Fragment

<222> (1)..(445)

<223>

<400> 40  
aagcttgcac gaggcaaagc aaaggttggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc 60  
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtc ctaacaacag caacgaagaa 120  
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180

Fischfutter.ST25.txt

ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaaa cagaataagt ccatggatgc	360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg tcgac	445

<210> 41  
 <211> 446  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> Antisense Fragment  
 <222> (1)..(446)  
 <223>

<400> 41	
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggtggt tggtggtggt gttgagagac actccaatcc	60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa	120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat	180
ggcggctttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaagcaaa cagaataagt ccatggatgc	360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg gaccc	446

<210> 42  
 <211> 393  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> Sense Fragment  
 <222> (1)..(393)  
 <223>

Fischfutter.ST25.txt

```

<400> 42
aagcttttga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg 60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtggggggtt cttggatctt cgttatcatc 120
aactgacttg ataatatattg cgtttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180
gggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata 300
tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

```

<210> 43

<211> 397

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1)..(397)

<223>

```

<400> 43
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60
tccggacttt ctccgcttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttgga tcttcgttat 120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180
gaatgggtct ggtagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240
tcttcacgat ataaataact ctagtcgcga tcagtttaga ttataggcac atcttgcata 300
tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360
ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397

```

<210> 44

<211> 1537

<212> DNA

<213> -

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1537)

Fischfutter.ST25.txt

<223>

<400> 44  
gagctctaca aattaggggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60  
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcaactttct tattcatacc 120  
tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt 180  
tcacgttttt aacatctttc tttatttctt gtccacttcg tttaggggatg cctaagtgtcc 240  
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300  
aatacaaata aagtgaacaa aaatatctat aaataaacia atatataat tttgttagac 360  
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg 420  
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc 480  
aaaccctat ttaaataagct aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540  
attgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc cttagctattt 600  
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660  
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattta aataaaaaag actaataaat 720  
atataaaatg aatgttcata cgcagacca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780  
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840  
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900  
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960  
cacaaccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctcaacaggt tcaatagtca 1020  
atattagggt ttattggact tttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat 1080  
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140  
cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcggttg gctcgtttta 1200  
ctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta 1260  
acaagccacg ttgctgtcca ttgccaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320  
acctcaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380  
ttgaattcta tttctcttta tttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440  
taaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500  
gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

<210> 45

<211> 734

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

# Fischfutter.ST25.txt

<220>

<221> variation

<222> (1)..(734)

<223>

```

<400> 45
ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc      60
cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc      120
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtaggatcg      180
gagctgcttt ttgttcaa atgacagaat aagtcctatg atgcacagtc tagcctatcc      240
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat      300
gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc      360
tagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg      420
tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgttga atgagggtta atggagtta      480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggtagtggt gatattaaag acggscaata      540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct      600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta      660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggttg tgagagacac tccaatccaa      720
acagatacaa ggcg      734

```

<210> 46

<211> 280

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> variation

<222> (1)..(280)

<223>

```

<400> 46
gtcagagtatg gaggttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat      60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acatacaacg      120
tggcttttaa agatggcttg gctgctaata aactcaactc aactcatatc ctatccattc      180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggttg ttgttggttg      240

```

tgttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga

280

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Sense Promotor

&lt;222&gt; (1)..(358)

&lt;223&gt;

&lt;210&gt; 47

cttaccg atagtaaaat cgtagttat gattaatact tgggagggtgg gggattatag 60

gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgaggttaaa 120

tggagtttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180

cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240

aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300

tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaaggttg tttgttgttg ttgtcgac 358

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 361

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Antisense Promotor

&lt;222&gt; (1)..(361)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 48

ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60

taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgaggtt 120

aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggatgatg gggatattaa 180

agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240

taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc 300

aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggatc 360  
 c 361

<210> 49  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(28)  
 <223>

<400> 49 28  
 gagctcactc actgatttcc attgcttg

<210> 50  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(37)  
 <223>

<400> 50 37  
 cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

<210> 51  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(34)



<223>

<400> 51  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 52  
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 53  
gaaaataactt catcagcatt acc

23

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 54  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 55  
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 56  
aagcttgac gaggcaaagc aaagggtg

28

<210> 57  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 57  
gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 58  
aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 59  
gaattcgac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 60  
aagctttgga ttagcactga ttgtc

25

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 61  
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 62

<211> 29

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 62  
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 63  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(27)  
<223>

<400> 63  
tttctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 64  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(23)  
<223>

<400> 64  
tcttggtat ctgtttggat tgg

23

<210> 65  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(24)  
<223>

<400> 65  
ctaacaatca atgagtatga gagc

<210> 66

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 66  
agagcaaggc cagcaggacc acaacc

<210> 67

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 67  
ccttgggagc ttttgggata ggctag

<210> 68

<211> 26

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 68  
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 69

<211> 15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(15)

<223>

<400> 69  
gtcgagtatg gagtt

15

<210> 70

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 70  
aagcttaccg atagtaaaat cgttagtt

28

<210> 71

<211> 31

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

Fischfutter.ST25.txt

<221> Primer

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 71

ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t

31

<210> 72

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<400> 72

cgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 73

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 73

ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>



<400> 74  
gtcgcactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 75  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 76  
gagctctaca aattaggggtt ac

22

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

Fischfutter.ST25.txt

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 77  
aagcttatta tttccaaatt ccg

23

<210> 78

<211> 50

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<21> Primer

<22> (1)..(50)

<223>

<400> 78  
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagcta gcagcgacag

50

<210> 79

<211> 1062

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<21> CDS

<222> (32)..(1021)

<223>

<400> 79  
aagctttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta  
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val  
1 5

52

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag  
Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu  
10 15 20

100

aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag  
Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln  
25 30 35

148

## Fischfutter.ST25.txt

tac	tcg	ctt	ccg	tca	gag	gag	tca	gac	gcg	gcc	cgc	ccg	gga	ctg	aag	196
Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys	
40					45				50						55	
aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc	gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcg	244
Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala	
				60				65						70		
cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gcc	gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt	292
Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe	
			75				80						85			
caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg	gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg	340
Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val	
		90				95				100						
tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	ggt	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac	388
Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His	
	105					110				115						
atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt	436
Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	
					125					130					135	
c	acc	acg	cat	gat	gct	atg	cat	ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg	484
Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg	
				140				145						150		
cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	gta	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg	532
Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp	
			155					160					165			
ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac	580
Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His	
		170					175					180				
act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc	628
Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly	
	185				190						195					
att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcg	atg	tgg	676
Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp	
	200				205				210						215	
cag	ttt	ggc	cgc	ctc	gca	tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	ggt	724
Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly	
				220					225					230		
gcg	cca	atg	gcg	aac	ctg	ctg	gtg	ttc	atg	gcg	gcc	gcg	ccc	atc	ctg	772
Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	
			235					240					245			
tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	ttc	tac	ttt	ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct	820
Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro	
		250					255					260				
gag	cct	ggc	gcc	gcg	tca	ggc	tct	tca	cca	gcc	gtc	atg	aac	tgg	tgg	868
Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp	
	265				270						275					
aag	tcg	cgc	act	agc	cag	gcg	tcc	gac	ctg	gtc	agc	ttt	ctg	acc	tgc	916
Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys	
	280				285					290					295	
tac	cac	ttc	gac	ctg	cac	tgg	gag	cac	cac	cgc	tgg	ccc	ttt	gcc	ccc	964
Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	Trp	Glu	His	His	Arg	Trp	Pro	Phe	Ala	Pro	
				300				305						310		

## Fischfutter.ST25.txt

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012  
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val  
 315 320 325

cct gcc tag ctggacacac tgcagtgggc cctgctgccca gctgggcatg c 1062  
 Pro Ala

<210> 80

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 80

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val  
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp  
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp  
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala  
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp  
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser  
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu  
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly  
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val  
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys  
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp  
 180 185 190

Fischfutter.ST25.txt

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met  
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr  
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe  
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly  
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser  
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp  
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His  
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg  
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala  
 325

<210> 81  
 <211> 789  
 <212> DNA  
 <213> Nostoc punctiforme

<20>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(789)  
 <223>

<400> 81  
 ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48  
 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
 1 5 10 15

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96  
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
 20 25 30

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144  
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn

## Fischfutter.ST25.txt

35

40

45

tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa	192
Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln	
50 55 60	
atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat	240
Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His	
65 70 75 80	
ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca	288
Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser	
85 90 95	
cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag	336
Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys	
100 105 110	
aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat	384
Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp	
115 120 125	
ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc	432
Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe	
130 135 140	
atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta	480
Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu	
145 150 155 160	
ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc	528
Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile	
165 170 175	
tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat	576
Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr	
180 185 190	
ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat	624
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr	
195 200 205	
ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc	672
Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile	
210 215 220	
t tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat	720
a Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
225 230 235 240	
gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac	768
Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn	
245 250 255	
aat tca gta acc aat tgc taa	789
Asn Ser Val Thr Asn Ser	
260	

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 262

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Nostoc punctiforme

Fischfutter.ST25.txt

<400> 82

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln  
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val  
20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn  
35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln  
50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His  
65 70 75 80

Tyr Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser  
85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys  
100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp  
115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe  
130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu  
145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile  
165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr  
195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile  
210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn  
245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser

260

<210> 83  
 <211> 762  
 <212> DNA  
 <213> Nostoc punctiforme

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(762)  
 <223>

400> 83	g atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca	48
	t ile gln leu glu gln pro leu ser his gln ala lys leu thr pro	
	5 10 15	
	gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc	96
	val leu arg ser lys ser gln phe lys gly leu phe ile ala ile val	
	20 25 30	
	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac	144
	ile val ser ala trp val ile ser leu leu leu ser leu asp	
	35 40 45	
	atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa	192
	ile ser lys leu lys phe trp met leu leu pro val ile leu trp gln	
	50 55 60	
	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat	240
	thr phe leu tyr thr gly leu phe ile thr ser his asp ala met his	
	65 70 75 80	
	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca	288
	gly val val phe pro gln asn thr lys ile asn his leu ile gly thr	
	85 90 95	
	g acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa	336
	leu thr leu ser leu tyr gly leu leu pro tyr gln lys leu leu lys	
	100 105 110	
	aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat	384
	lys his trp leu his his his asn pro ala ser ser ile asp pro asp	
	115 120 125	
	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt	432
	phe his asn gly lys his gln ser phe phe ala trp tyr phe his phe	
	130 135 140	
	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att	480
	met lys gly tyr trp ser trp gly gln ile ile ala leu thr ile ile	
	145 150 155 160	
	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act	528
	tyr asn phe ala lys tyr ile leu his ile pro ser asp asn leu thr	
	165 170 175	



Fischfutter.ST25.txt

tac	ttt	tgg	gtg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat	576
Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
			180					185					190			
ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	gtt	cag	624
Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
		195					200					205				
cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc	672
Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
		210				215					220					
acg	tgc	tat	cat	ttt	ggc	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat	720
Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
225					230					235					240	
att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag			762
Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
				245					250							

<210> 84

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 84

Met	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro
1				5					10					15	
Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val
			20					25					30		
Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp
		35					40					45			
Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Gln
	50					55					60				
Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His
65					70					75				80	
Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr
				85					90					95	
Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys
			100					105					110		
Lys	His	Trp	Leu	His	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp
		115					120					125			
Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe
	130					135					140				

Fischfutter.ST25.txt

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile  
145 150 155 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr  
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr  
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln  
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile  
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His  
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys  
245 250

<210> 85

<211> 804

<212> DNA

<213> Synechococcus WH8102

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 85	
atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac	48
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His	
1 5 10 15	
cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc	96
Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala	
20 25 30	
ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144
Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu	
35 40 45	
tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192
Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu	
50 55 60	
ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg	240
Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu	

## Fischfutter.ST25.txt

65	70										75					80					
ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat																					288
Phe Ile Val Ala His 85 Asp Ser Met His 90 Ala Ser Leu Val Pro Gly 95 His																					
ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca																					336
Pro Gly Leu Asn 100 Arg Trp Ile Gly 105 Val Tyr Leu Leu Val 110 Tyr Ala																					
ggc ttg tct tat gag cgt tgt tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg																					384
Gly Leu Ser 115 Tyr Glu Arg Cys 120 Ser Arg Asn His Arg Arg 125 His His Leu																					
gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac																					432
Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp 135 Pro Asp Tyr Gln Arg 140 Cys Thr Asn Asn																					
aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg																					480
Asn Ile Leu Asp Trp Tyr 150 Val His Phe Met Gly 155 Asn Tyr Leu Gly 160 Met																					
cgg caa ctg tta aat cta agc tgt ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc																					528
Gly Gln Leu Leu Asn 165 Leu Ser Cys Leu Trp 170 Leu Ala Leu Ile 175 Ile Leu																					
aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc																					576
Asn Gly Ser Asp 180 Leu Pro Ala Gln 185 Ile Met His Leu Leu 190 Leu Phe Ser																					
gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgt caa ttg ttt cta gtg gga acc																					624
Val Leu Pro 195 Leu Ile Ile Ser 200 Cys Gln Leu Phe 205 Leu Val Gly Thr																					
tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg																					672
Trp Leu Pro His Arg Arg Gly 215 Ala Thr Thr Arg Pro 220 Gly Val Thr Thr																					
cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgt tac aac																					720
Arg Ser Leu Ala Leu His 230 Pro Ala Leu Ser Phe 235 Ala Ala Cys Tyr Asn 240																					
ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt																					768
Phe Gly Tyr His Arg 245 Glu His His Glu Ser 250 Pro Ser Thr Pro 255 Trp Phe																					
g ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga																					804
n Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr																					

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 267

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Synechococcus WH8102

&lt;400&gt; 86

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His  
1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala  
Seite 75

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu  
 35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu  
 50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His  
 85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala  
 100 105 110

Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu  
 115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn  
 130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met  
 145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu  
 165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser  
 180 185 190

Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr  
 195 200 205

Pro Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr  
 210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn  
 225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe  
 245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr  
 260 265

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

Fischfutter.ST25.txt

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 87  
gcatgctcta gaccttataa agatattttg tga

33

<210> 88

<211> 33

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 88  
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac cat

33

<210> 89

<211> 805

<212> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> variation

<222> (1)..(805)

<223>

<400> 89  
gcatgcatct agaaatgggt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactgggtgt 60  
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggatatattt attgcctgct 120

Fischfutter.ST25.txt

ttatcttatt tttatgggca attagtttaa tcttattact ctcaatagat acatccataa	180
ttcataagag cttattaggt atagccatgc tttggcagac cttcttatat acaggtttat	240
ttattactgc tcatgatgcc atgcacggcg tagtttatcc caaaaatccc agaataaata	300
atcttatagg taagctcact ctaatcttgt atggactact cccttataaa gatttattga	360
aaaaacattg gttacaccac ggacatcctg gtactgattt agaccctgat tattacaatg	420
gtcatcccca aaacttcttt ctttggtatc tacattttat gaagtcttat tggcgatgga	480
cgcaaatttt cggattagtg atgatttttc atggacttaa aaatctggtg catataccag	540
aaaataattt aattatattt tggatgatac cttctatttt aagttcagta caactatttt	600
atcttggtac atctttgcct cataaaaage tagaagggtg ttatactaac cccattgtg	660
cgcgcagtat ccattacct cttttttggt cttttgttac ttgttatcac ttcggctacc	720
acaaggaaca tcacgaatac cctcaacttc cttggtggaa attacctgaa gctcacaaaa	780
tatctttata aggtctagag catgc	805

<210> 90

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(35)

<223>

<400> 90

gtctttca ttatttcgat ttgatttcg tgacc

35

<210> 91

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(44)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 91  
aagcttgagc tcggttgatc agaagaagaa gaagaagatg aact

44

<210> 92

<211> 653

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(653)

<223>

<400> 92  
gagctcttca ttatttcgat ttgatttcg tgaccagcga acgcagaata ccttggtgtg 60  
taataacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagctttttg tagttgaatt 120  
tctctggctg atcttttctg tacagattca tatatctgca gagacgatat cattgattat 180  
ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttgggatgag agctctatgt atgtgtgtaa 240  
actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggagggg tgactccatg tcaaaataga 300  
tgtcataaga ggcccatcaa taagtgcctg agcccattag ctagcccagt aactaccaga 360  
ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt ttgatgtag gactgaaatg tgaacaacag 420  
gcgcatgaaa ggctaaatta ggacaatgat aagcagaaat aacttatcct ctctaact 480  
tggcctcaca ttgcccttca cacaatccac acacatccaa tcacaacctc atcatatatc 540  
tcccgcta atcttttttct ttgatctttt tttttttgct tattattttt ttgactttga 600  
cccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt 653

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 93  
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 94

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 94  
agcttgagc tctttgttga agagatttgg

30

<210> 95

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 95  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 96

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(34)



<223>

<400> 96  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34